

***SANDRA REGINA MIRANDOLA***

**DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL INDUZIDA POR  
METILMALONATO E 3-NITROPROPIONATO**

***CAMPINAS***

***2008***

**SANDRA REGINA MIRANDOLA**

**DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL INDUZIDA POR  
METILMALONATO E 3-NITROPROPIONATO**

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da  
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de  
Campinas, para a obtenção do título de Doutor em  
Fisiopatologia Médica. Área de concentração em Biologia  
Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento.*

**ORIENTADOR: PROF. DR. ROGER FRIGÉRIO CASTILHO**

**CAMPINAS**

**2008**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

M672d      Mirandola, Sandra Regina  
Disfunção mitocondrial induzida por metilmalonato e 3-nitropropionato / Sandra Regina Mirandola. Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Roger Frigério Castilho  
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Cálcio. 2. Succinato. 3. Erro inato do metabolismo. 4. Lactato desidrogenase. 5. Ácido Metilmalônico. 6. Neurodegeneração.  
I. Castilho, Roger Frigério. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês: Mitochondrial dysfunction induced by methylmalonate and 3-nitropropionate**

**Keywords:** • Calcium  
• Succinate  
• Metabolism, Inborn error  
• Lactate Dehydrogenase  
• Methylmalonic Acid  
• Neurodegeneration

**Titulação: Doutor em Fisiopatologia Médica**

**Área de concentração: Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento**

**Banca examinadora:**

**Prof. Dr. Roger Frigério Castilho**

**Prof. Dr. Carlos Curti**

**Profa. Dra. Marilene Demasi**

**Profa. Dra. Lília Freire Rodrigues de Souza Li**

**Profa. Dra. Daniela Pereira Crosara Alberto**

**Data da defesa: 15 - 07 - 2008**

---

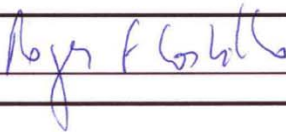
## Banca examinadora da tese de Doutorado

---

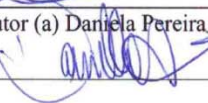
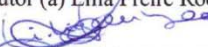
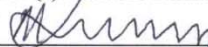
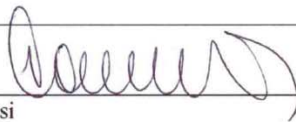
---

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Roger Frigério Castilho

---



<b>Membros:</b>
Professor (a) Doutor (a) Carlos Curti
Professor (a) Doutor (a) Marilene Demasi
Professor (a) Doutor (a) Lília Freire Rodrigues de Souza Li
Professor (a) Doutor (a) Daniela Pereira Crosara Alberto



Curso de pós-graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

---

Data: 15/07/2008

---

O presente trabalho foi realizado nos Laboratórios de Bioenergética e de Metabolismo Energético em Neurodegeneração, Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental (NMCE), Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), sob a orientação do Prof. Dr. Roger Frigério Castilho, na vigência dos auxílios concedidos pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundo de Apoio ao Ensino, à Pesquisa e à Extensão (FAEPEX, Unicamp).

Ao meu orientador Professor Dr. Roger Frigério Castilho, pela singular orientação, discussões científicas, valiosos aprendizados e contribuição para meu desenvolvimento científico.

Ao Professor Dr. Anibal Eugênio Vercesi pela oportunidade de fazer parte da sua equipe e pelas discussões pertinentes à literatura.

Aos professores membros da pré-banca e banca Dr. Carlos Curti, Dra. Marilene Demasi, Dra. Lília Freire Rodrigues de Souza Li, Dra. Daniela Pereira Crosara Alberto, Dra. Íscia Teresinha Lopes Cendes e Dra. Nicola Amanda Conran Zorzetto pelas revisões e sugestões.

Aos colegas do Laboratório de Bioenergética pela convivência durante estes anos. Agradeço principalmente aos que se tornaram indispensáveis e amigos. Agradeço em especial à Daniela Melo pela colaboração e amizade.

Aos meus pais, que sempre estiveram ao meu lado, incentivando e apoiando minhas escolhas.

Ao meu irmão, pela constante amizade e generosidade.

Às amigas que permaneceram presentes no decorrer desta etapa.

Ao Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa para o desenvolvimento dessa tese.

A Deus, eterno e sábio professor, a quem agradeço cada ensinamento.

Por fim, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram e compartilharam desse período de estudos.

*“... Descobri como é bom chegar quando se tem paciência.*

*E para se chegar onde quer que seja,*

*aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão.*

*É preciso antes de mais nada querer.”*

*Amyr Klink*

<b>RESUMO</b> .....	xxvii
---------------------	-------

<b>ABSTRACT</b> .....	xxxiii
-----------------------	--------

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	39
----------------------------	----

1.1. Função mitocondrial, estresse oxidativo e homeostase intracelular de $\text{Ca}^{2+}$ ....	42
-------------------------------------------------------------------------------------------------	----

1.2. Transição de permeabilidade mitocondrial e morte celular	46
---------------------------------------------------------------	----

1.3. Acidemia metilmalônica (MMAemia).....	51
--------------------------------------------	----

1.4. Aspectos genéticos da acidemia metilmalônica	52
---------------------------------------------------	----

1.5. Epidemiologia e sintomatologia da acidemia metilmalônica .....	53
---------------------------------------------------------------------	----

1.6. Neuropatologia da acidemia metilmalônica.....	54
----------------------------------------------------	----

1.7. Tratamento na acidemia metilmalônica .....	55
-------------------------------------------------	----

1.8. Disfunção mitocondrial na acidemia metilmalônica.....	55
------------------------------------------------------------	----

1.9. Neurodegeneração induzido pelo ácido 3-nitropropiónico .....	57
-------------------------------------------------------------------	----

<b>2. OBJETIVOS</b> .....	63
---------------------------	----

<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	67
-------------------------------------	----

3.1. Reagentes .....	69
----------------------	----

3.2. Animais de experimentação .....	69
--------------------------------------	----

3.3. Homogenatos de fígado e cérebro .....	69
--------------------------------------------	----

3.4. Tratamento <i>in vivo</i> com 3-NP .....	70
-----------------------------------------------	----



3.5.	Isolamento das frações mitocondriais.....	70
3.6.	Isolamento de partícula submitocondrial invertida de fígado.....	72
3.7.	Determinação de proteína .....	73
3.8.	Medida da atividade da lactato desidrogenase (LDH) .....	73
3.9.	Medida da atividade da succinato desidrogenase (SDH).....	74
3.10.	Medida do consumo de oxigênio .....	74
3.11.	Potencial elétrico de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ ) .....	75
3.12.	Medida de inchamento mitocondrial .....	75
3.13.	Análise estatística.....	75
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>77</b>
4.1.	Parte A - Efeito <i>in vitro</i> de metilmalonato (MMA) na atividade da lactato desidrogenase (LDH).....	79
4.2.	Parte B - Efeito de MMA na oxidação de substratos respiratórios por mitocôndrias isoladas.....	86
4.3.	Parte C - Caracterização da transição de permeabilidade mitocondrial (MPT) induzida pelo inibidor da succinato desidrogenase 3-nitropropionato .....	96
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>111</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>121</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>125</b>
<b>8.</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>147</b>

## ***LISTA DE ABREVIATURAS***

---

<b>AdoCbl</b>	5-Deoxiadenosilcobalamina
<b>ADP</b>	Adenosina difosfato
<b>AIF</b>	Fator indutor de apoptose
<b>Alm</b>	Alameticina
<b>ANT</b>	Translocador de nucleodídeo de adenina
<b>ATP</b>	Adenosina 5'-trifosfato
<b>BHE</b>	Barreira hemato-encefálica
<b>BM</b>	Mitocôndria de cérebro de rato
<b>BSA</b>	Albumina soro bovina
<b>BtMA</b>	Butilmalonato
<b>CsA</b>	Ciclosporina A
<b>CuZnSOD</b>	Enzima superóxido dismutase dependente de cobre e zinco
<b>CypD</b>	Ciclofilina D
<b>DCPIP</b>	2,6-Diclorofenolindolfenol
<b><math>\Delta\psi</math></b>	Potencial elétrico de membrana mitocondrial
<b>EGTA</b>	Etileno glicol-bis( $\beta$ -aminoetil éter)- <i>N,N,N',N'</i> -ácido tetracético
<b>EROs</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>FAD</b>	Flavina Adenina Dinucleotídeo (Flavoproteína)
<b>FADH<sub>2</sub></b>	Flavina Adenina Dinucleotídeo Reduzido
<b>FCCP</b>	Carbonyl cyanide p-(trifluoromethoxy)phenyl-hydrazone
<b>GPx</b>	Glutathione peroxidase
<b>GR</b>	Glutathione reductase
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrogênio
<b>HEPES</b>	N-[2hydroxyethyl]piperazine-N'-[2ethanesulfonic acid])
<b>HM</b>	Mitocôndria isolada de coração de rato
<b>IC<sub>50</sub></b>	Inibição de 50%
<b>IP<sub>3</sub></b>	Inositol trifosfato
<b>K<sub>i</sub></b>	Constante de inibição
<b>K<sub>m</sub></b>	Constante de Michaelis-Menten

<b>KM</b>	Mitocôndria isolada de rim de rato
<b>LDH</b>	Enzima lactato desidrogenase
<b>LM</b>	Mitocôndria de fígado de rato
<b>MA</b>	Malonato
<b>MCM</b>	Metilmalonil-CoA mutase
<b>mGluR</b>	Receptor metabotrópico de glutamato
<b>MMA</b>	Metilmalonato
<b>MMAemia</b>	Acidemia metilmalônica
<b>MnSOD</b>	Enzima superóxido dismutase dependente de manganês
<b>MPT</b>	Transição de permeabilidade mitocondrial
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
<b>NADH</b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo monofosfato
<b>NMDA</b>	Receptor ionotrópico <i>N</i> -metil-D-aspartato
<b>O<sub>2</sub>•<sup>-</sup></b>	Radical ânion superóxido
<b>OH•</b>	Radical hidroxila
<b>P<sub>i</sub></b>	Fosfato inorgânico
<b>PMS</b>	Fenazina metassulfato
<b>RE</b>	Retículo endoplasmático
<b>SDH</b>	Enzima succinato desidrogenase
<b>SMP</b>	Partícula submitocondrial invertida
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>SOD</b>	Enzima superóxido dismutase
<b>TMPD</b>	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametil-p-fenilendiamina
<b>TP<sub>x</sub></b>	Tiorredoxina peroxidase
<b>TR</b>	Tiorredoxina redutase
<b>UQ</b>	Coenzima Q
<b>UQH•</b>	Semiquinona
<b>UQH<sub>2</sub></b>	Coenzima Q reduzida
<b>VDAC</b>	Canal aniônico voltagem dependente
<b>3-NP</b>	3-nitropropionato

## ***LISTA DE TABELAS***

---

***PÁG.***

<b>TABELA I</b> - Efeito de malonato, metilmalonato e butilmalonato na atividade da succinato desidrogenase.....	92
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

	<b>PÁG.</b>
<b>FIGURA 1</b> - Homeostase intracelular de $\text{Ca}^{2+}$ em neurônios glutamatérgicos .....	45
<b>FIGURA 2</b> - Permeabilização da membrana mitocondrial interna (MPT) .....	47
<b>FIGURA 3</b> - Metabolismo de aminoácidos, ácidos graxos e propionato com acúmulo de MMA .....	52
<b>FIGURA 4</b> - Estruturas químicas de succinato, malonato (MA) e metilmalonato (MMA) .....	56
<b>FIGURA 5</b> - Esquema representando a ação do 3-NP sobre a cadeia respiratória e succinato desidrogenase (SDH) .....	58
<b>FIGURA 6</b> - Estrutura química do 3-NP e succinato .....	59
<b>FIGURA 7</b> - Efeito de metilmalonato (MMA) na conversão de piruvato a lactato catalisada pela lactato desidrogenase (LDH) .....	81
<b>FIGURA 8</b> - Efeito de MMA na conversão de lactato a piruvato catalisada pela LDH .....	83
<b>FIGURA 9</b> - Caracterização do efeito inibitório in vitro do MMA na atividade da LDH de cérebro em converter lactato a piruvato .....	85
<b>FIGURA 10</b> - Efeito de MMA no consumo de oxigênio mitocondrial .....	87
<b>FIGURA 11</b> - Efeito de MMA na respiração mantida por succinato em mitocôndrias isoladas de músculo .....	89
<b>FIGURA 12</b> - Efeito de MA, MMA e BtMA na respiração de mitocôndrias intactas ou permeabilizadas com alameticina .....	91
<b>FIGURA 13</b> - Efeito de MA e MMA no consumo de oxigênio por partículas submitocondriais .....	93
<b>FIGURA 14</b> - Efeito da pré-incubação com MA e MMA na atividade da SDH de mitocôndrias .....	95

<b>FIGURA 15</b> - Inibição da atividade da SDH após tratamento <i>in vivo</i> com ácido 3-nitropropiónico (3-NP).....	97
<b>FIGURA 16</b> - Queda do potencial transmembrânico induzido pela adição de $\text{Ca}^{2+}$ a mitocôndrias de cérebro de animais tratados com 3-NP.....	99
<b>FIGURA 17</b> - Inibição do complexo II da cadeia respiratória mitocondrial na presença de 3-NP .....	100
<b>FIGURA 18</b> - Transição de permeabilidade mitocondrial (MPT) induzida por $\text{Ca}^{2+}$ e 3-NP em mitocôndrias isoladas de cérebro de rato (BM) .....	102
<b>FIGURA 19</b> - A transição de permeabilidade mitocondrial induzida por $\text{Ca}^{2+}$ e 3-NP ocorre mesmo na presença de inibidores fisiológicos da transição de permeabilidade mitocondrial (MPT).....	104
<b>FIGURA 20</b> - Transição de permeabilidade mitocondrial (MPT) induzida por $\text{Ca}^{2+}$ e 3-NP em mitocôndrias isoladas de diferentes tecidos.....	106
<b>FIGURA 21</b> - Mitocôndrias de cérebro e coração são mais sensíveis à perda da metade do potencial transmembrânico na presença de $\text{Ca}^{2+}$ e 3-NP quando comparadas às mitocôndrias de fígado e rim. ....	107
<b>FIGURA 22</b> - Transição de permeabilidade mitocondrial (MPT) induzida por $\text{Ca}^{2+}$ e 3-NP em mitocôndrias isoladas de diferentes tecidos cerebrais. ....	109
<b>FIGURA 23</b> - Proposta de eventos envolvidos na morte neuronal induzida pela inibição parcial da enzima SDH .....	120

## *Resumo*

A acidemia metilmalônica (MMAemia) é uma desordem metabólica hereditária do metabolismo de aminoácidos com cadeia ramificada e de ácidos graxos com cadeia ímpar, envolvendo um defeito na conversão de metilmalonil-CoA a succinil-CoA. Manifestações sistêmicas e neurológicas nesta doença são relacionadas com o acúmulo de metilmalonato (MMA) em tecidos e fluidos biológicos e com o comprometimento do metabolismo energético. Neste trabalho, verificou-se que o MMA inibiu com grande intensidade a conversão de lactato a piruvato catalisada pela enzima lactato desidrogenase (LDH) em homogenatos de fígado e cérebro de rato. A conversão de piruvato a lactato, catalisada pela LDH, foi menos sensível à inibição por MMA. Estudos de cinética enzimática sobre a inibição da LDH de cérebro, utilizando-se lactato como substrato, indicaram que o MMA inibe esta enzima competitivamente ( $K_i = 3,02 \pm 0,59$  mM). Propôs-se que a inibição da conversão lactato/piruvato por MMA contribui para a fisiopatologia da MMAemia, resultando, dentre outras alterações, em acúmulo de lactato e acidemia metabólica.

Mostrou-se que, em mitocôndrias isoladas de cérebro e músculo de rato, concentrações milimolares de MMA inibiram o consumo de  $O_2$  mantido por succinato, enquanto nenhum efeito inibitório foi observado quando substratos para os complexos I ou IV foram utilizados. Notadamente, o efeito inibitório de MMA, mas não de malonato, no consumo mitocondrial de  $O_2$  mantido por succinato foi minimizado quando uma permeabilização não-seletiva das mitocôndrias foi induzida por alameticina. Em adição, o MMA apresentou apenas um pequeno efeito inibitório no consumo de  $O_2$  por partículas submitocondriais invertidas na presença de succinato. Não se obteve evidência de produção de malonato nas mitocôndrias tratadas com MMA. Conclui-se que o MMA inibe o consumo mitocondrial de  $O_2$  na presença de succinato por interferir na captação deste substrato pela mitocôndria. A inibição do transporte mitocondrial de substratos, induzida pelo MMA, através do carreador de dicarboxilatos, pode ter importantes implicações fisiopatológicas na MMAemia.

Comparou-se a suscetibilidade de mitocôndrias isoladas de fígado, rim e coração de rato, assim como de diferentes subregiões cerebrais quanto à transição de permeabilidade mitocondrial (MPT) induzida por 3-nitropropionato (3-NP) e  $Ca^{2+}$ . A MPT foi estimada pela queda do potencial elétrico transmembrana e inchamento mitocondrial



sensíveis à ciclosporina A. Mitocôndrias de cérebro e coração foram mais suscetíveis à MPT induzida por 3-NP e  $\text{Ca}^{2+}$  que organelas isoladas de fígado e rim. A comparação de mitocôndrias de diferentes regiões cerebrais indicou que uma inibição parcial da respiração por 3-NP resultou em MPT mais rapidamente em organelas estriatais que corticais ou cerebelares. Em ratos tratados sistemicamente com 3-NP, verificou-se uma inibição de mesma magnitude da succinato desidrogenase em todos os tecidos estudados. Notadamente, mitocôndrias isoladas de cérebro de ratos tratados sistemicamente com 3-NP apresentaram uma maior suscetibilidade à MPT induzida por  $\text{Ca}^{2+}$  quanto comparadas a controles. Propôs-se que a maior suscetibilidade do estriado à neurodegeneração induzida por 3-NP pode ser, pelo menos em parte, explicada por uma maior vulnerabilidade desta região cerebral à MPT, juntamente com a vulnerabilidade desta região ao influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico mediado pelo estímulo de receptores de glutamato.

# *Abstract*

Methylmalonic acidemia (MMAemia) is an inherited metabolic disorder of branched amino acid and odd-chain fatty acid metabolism, involving a defect in the conversion of methylmalonyl-coenzyme A to succinyl-coenzyme A. Systemic and neurological manifestations in this disease are thought to be associated with the accumulation of methylmalonate (MMA) in tissues and biological fluids with consequent impairment of energy metabolism. In the present work it was observed that MMA potently inhibited lactate dehydrogenase (LDH)-catalyzed conversion of lactate to pyruvate in liver and brain homogenates. LDH was about one order of magnitude less sensitive to inhibition by MMA when catalyzing the conversion of pyruvate to lactate. Kinetic studies on the inhibition of brain LDH indicated that MMA inhibits this enzyme competitively with lactate as a substrate ( $K_i = 3.02 \pm 0.59$  mM). We proposed that inhibition of the lactate/pyruvate conversion by MMA contributes to the MMAemia physiopathology, leading to lactate accumulation and metabolic acidemia.

While millimolar concentrations of MMA inhibit succinate-supported  $O_2$  consumption by isolated rat brain or muscle mitochondria, there is no effect when either a pool of NADH-linked substrates or *N,N,N',N'*-tetramethyl-p-phenyldiamine (TMPD)/ascorbate were used as electron donors. Interestingly, the inhibitory effect of MMA, but not of malonate, on succinate-supported brain mitochondrial  $O_2$  consumption was minimized when nonselective permeabilization of mitochondrial membranes was induced by alamethicin. In addition, only a slight inhibitory effect of MMA was observed on succinate-supported  $O_2$  consumption by inside-out submitochondrial particles. Under our experimental conditions, there was no evidence of malonate production in MMA-treated mitochondria. We conclude that MMA inhibits succinate-supported mitochondrial  $O_2$  consumption by interfering with the uptake of this substrate. MMA-induced inhibition of substrate transport by the mitochondrial dicarboxylate carrier may have important physiopathological implications.

The susceptibility of isolated mitochondria from liver, kidney and heart and different rat brain regions (striatum, cortex and cerebellum) was compared regarding to mitochondrial permeability transition (MPT) evoked by 3-nitropropionate (3-NP) and  $Ca^{2+}$  ions. In general, isolated brain mitochondria from different regions were more sensitive to

3-NP and  $\text{Ca}^{2+}$  toxicity than mitochondria from liver and kidney as estimated by decrease in the transmembrane electrical potential and mitochondrial swelling. The comparison of different brain regions revealed that the inhibition of 50% of the mitochondrial succinate-supported respiration elicited by 3-NP resulted in a  $\text{Ca}^{2+}$ -induced MPT pore opening, inhibited by cyclosporin A, faster in striatal than in cortical and cerebellar mitochondria. It was verified an inhibition of succinate dehydrogenase activity from the same magnitude in all tissues studied after a 3-NP systemic treatment. Interestingly, isolated forebrain mitochondria obtained from rats systemically treated with 3-NP showed a more pronounced susceptibility to  $\text{Ca}^{2+}$ -induced MPT pore opening when compared to control rats. We proposed that the increased susceptibility of rat striatum to 3-NP-induced neurodegeneration could be in part explain by a region-specific susceptibility to MPT together with increase vulnerability of this brain region to glutamate receptors-mediated cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  influx.

## *1. Introdução*

## 1. Introdução

Doenças neurodegenerativas são um grupo heterogêneo de desordens caracterizadas por uma perda seletiva e gradual de sistemas neuronais, anatômica ou fisiológica como, por exemplo, as doenças de Alzheimer, Parkinson, Huntington e esclerose lateral amiotrófica.

Com os avanços recentes da genética molecular, alguns genes relacionados a doenças neurodegenerativas foram localizados e caracterizados em detalhe (Bertoli-Avella et al., 2004; Bossy-Wetzel et al., 2004). Esta identificação molecular consiste na avaliação da estrutura de componentes do DNA. As alterações nesta molécula podem ser de diferentes extensões como a perda de grandes porções do DNA, a simples troca de um de seus componentes ou outros rearranjos mais complexos. Em decorrência de uma mutação, um gene pode deixar de exercer a sua função ou adquirir funções distintas da original, levando ao aparecimento de doenças (Bertoli-Avella et al., 2004; Bossy-Wetzel et al., 2004). O uso de ferramentas moleculares que permitem a identificação pré e pós-sintomática dessas doenças tem gerado perspectivas de novas possibilidades terapêuticas.

São diversos os fatores passíveis de causar lesões neurológicas. Destacam-se, entre elas, além de doenças hereditárias e neurodegenerativas, o traumatismo encéfalo craniano, infecções, doenças vasculares e isquemia cerebral. Em geral, as lesões no SNC (Sistema nervoso central) são permanentes e causam deterioração irreversível do tecido nervoso (Lipton, 1999). A disfunção mitocondrial contribui nesse processo através de vias que podem levar à morte celular por apoptose ou necrose (Kroemer et al., 2007).

As mitocôndrias são organelas responsáveis pela respiração celular e síntese de ATP. Participam também da homeostase intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , síntese de esteróides, geração de radicais livres e morte celular. Recentemente tem sido demonstrado sua interação com algumas proteínas específicas relacionadas a doenças genéticas e neurodegenerativas (Lin e Beal, 2006).

Há vários estudos que comprovam a participação de alterações do metabolismo energético e da mitocôndria na morte celular e que a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (MPT) possui um papel regulatório sobre a viabilidade celular (Lin e Beal, 2006; Vercesi et al., 2006; Kroemer et al., 2007). Diante disto, o foco desta tese foi verificar o efeito de metilmalonato e 3-nitropropionato na atividade da lactato desidrogenase e na indução da disfunção mitocondrial e neurodegeneração.

### ***1.1. Função mitocondrial, estresse oxidativo e homeostase intracelular de $Ca^{2+}$ .***

A energia necessária para o processo de fosforilação oxidativa provém do potencial eletroquímico de prótons gerado pela cadeia de transporte de elétrons que reduz o  $O_2$  à  $H_2O$ . Esta energia é utilizada pela ATP sintase para fosforilar ADP à ATP. Assim, é a cadeia respiratória que controla a energia redox necessária para gerar este potencial de membrana mitocondrial e promover a fosforilação oxidativa (Mitchell, 1966).

Normalmente, elétrons provenientes das coenzimas NADH e  $FADH_2$ , reduzidas durante a oxidação de carboidratos, aminoácidos e ácidos graxos, são transferidos à NADH desidrogenase (complexo I). O complexo I transfere seus elétrons à forma oxidada da coenzima Q (UQ), gerando a forma reduzida desta coenzima ( $UQH_2$ ). Elétrons originados a partir do succinato passam para a UQ através do complexo II, resultando também na redução da coenzima Q. A  $UQH_2$  é, então, desprotonada, resultando na formação da espécie aniônica semiquinona ( $UQH^\bullet$ ), a forma que doa elétrons ao citocromo *c*. Existem dois conjuntos separados de  $UQH^\bullet$ , um na face citoplasmática e outro na face matricial da membrana mitocondrial interna, e as duas formas de  $UQH^\bullet$  são oxidadas juntas, regenerando UQ e doando elétrons para o complexo III. A seguir o citocromo *c* será reduzido e irá transferir elétrons a citocromo oxidase (complexo IV). Este complexo é responsável pela transferência de elétrons para o oxigênio, resultando na geração de água, em um processo envolvendo quatro passos consecutivos de transferência de um elétron (Devlin, 2003).

O sistema de transporte de elétrons mitocondrial é uma importante fonte de espécies reativas de oxigênio (EROs), sendo que seus principais sítios de formação são os complexos I e III (Boveris e Chance, 1973; Turrens, 2003). A citocromo oxidase promove a redução completa de uma molécula de  $O_2$  em duas moléculas de água e, para isto, são necessários 4 elétrons. No entanto, como consequência de sua configuração eletrônica, a molécula de  $O_2$  tem forte tendência em receber um elétron de cada vez formando uma série de intermediários tóxicos e reativos (Halliwell e Gutteridge, 1984), tais como: radical ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), e o radical hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ) (Halliwell e Gutteridge, 1984).

Em condições fisiológicas, o  $H_2O_2$  é formado na mitocôndria a partir do superóxido (Chance et al, 1979), numa reação catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD) (Fridovich, 1978). A isoforma da SOD presente na matriz mitocondrial é dependente de manganês (MnSOD), enquanto a isoforma da SOD presente no citosol é dependente de cobre e zinco (CuZnSOD) (Fridovich, 1978). O  $H_2O_2$  é uma espécie química permeável por membranas e mais estável, podendo ser removida por diferentes enzimas com atividade peroxidásica. A ERO mais reativa e citotóxica é o  $OH^{\bullet}$ , que pode ser gerado pelo  $H_2O_2$  quando reage com íons cobre ( $Cu^+$ ) ou ferro ( $Fe^{2+}$ ), reação conhecida como reação de Fenton (Halliwell e Gutteridge, 1997).

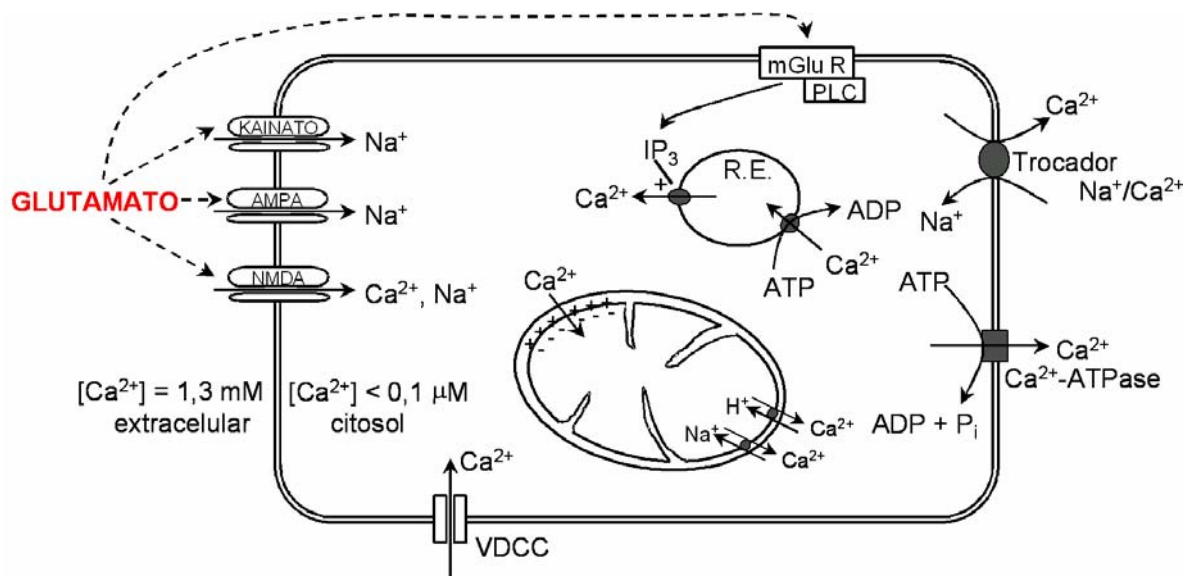
Para evitar o acúmulo de EROs, a mitocôndria desenvolveu um eficiente sistema antioxidante, responsável pela remoção destas espécies, mantendo assim a integridade da organela. A glutathione peroxidase (GPx) foi a primeira enzima antioxidante mitocondrial caracterizada (Flohe et al., 1973; Green e O'Brien, 1970). A remoção mitocondrial de  $H_2O_2$  pode também ser conduzida pela catalase (descrita até o presente momento em mitocôndrias de coração e fígado; Radi et al., 1991; Salvi et al., 2007) e tioredoxina peroxidase (TPx) (Rhee et al., 1994). Essas enzimas evitam o acúmulo de  $O_2^{\bullet-}$  e de  $H_2O_2$  e a consequente produção do  $OH^{\bullet}$ , contra o qual não existe nenhum sistema enzimático de defesa. Em condições em que ocorre um aumento da produção de  $O_2^{\bullet-}$  ou falha do sistema antioxidante, o  $H_2O_2$  pode se acumular e ocasionar estresse oxidativo. Nesta situação,



ocorre a formação radical  $\text{OH}^\bullet$  que é altamente reativo e pode promover a oxidação de componentes da mitocôndria (Kowaltowski et al., 2001).

Em regiões específicas do cérebro (substância *nigra*, *caudato putamen* e *globus pallidus*) o ferro encontra-se presente em altas concentrações, o que favorece a peroxidação lipídica e a oxidação de neurotransmissores devido ao  $\text{OH}^\bullet$  formado na reação de Fenton (Zecca et al., 2004). A oxidação de proteínas, um dos marcadores de estresse oxidativo do cérebro, está aumentada na neurodegeneração em modelos experimentais de doenças neurodegenerativas (Butterfield e Kanski, 2001) e em modelos de convulsões induzidos por MMA (Ribeiro et al, 2005).

EROs reagem com diversos aminoácidos podendo levar a agregação de proteínas e/ou fragmentação de cadeias polipeptídicas (Stadtman, 1990). As alterações que ocorrem em proteínas e lipídeos de membrana modificam o transporte de íons e aumentam os níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Dawson e Dawson, 1996). Nos eucariotos, as concentrações extracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  giram em torno de 1 a 2 mM (da ordem de  $10^{-3}$  M) e as concentrações intracelulares ao redor de 50 a 100 nM (da ordem de  $10^{-7}$  M) (Carafoli, 1987) (**Figura 1**). O gradiente eletroquímico formado entre os compartimentos intra e extracelulares possibilita a transdução de sinais bioquímicos ao interior das células (Clapham, 2007). A distribuição do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular é controlada por processos de transporte desse íon através da membrana plasmática e das membranas de organelas subcelulares, como o retículo endoplasmático, núcleo e a mitocôndria (Carafoli, 1987; Gunter e Gunter, 1994).



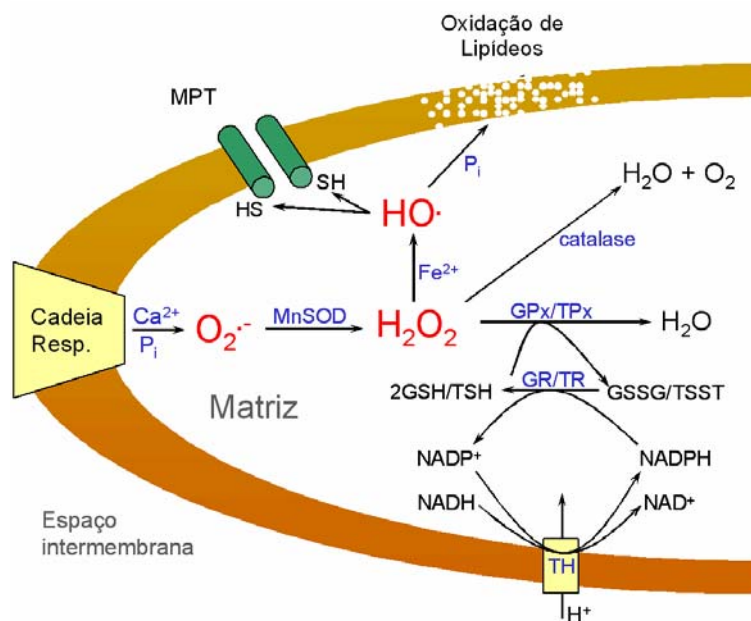
**Figura 1** – Homeostase intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  em neurônios glutamatérgicos. Glutamato extracelular ativa os receptores metabotrópicos (mGluR), levando a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo endoplasmático (RE) via inositol trifosfato ( $\text{IP}_3$ ). A ativação de receptores ionotrópicos de glutamato (AMPA e Kainato) promovem o influxo de  $\text{Na}^+$  para o citoplasma, enquanto a ativação do receptor ionotrópico (NMDA) promove o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Na}^+$ . A ativação dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  voltagem-dependente (VDCC) também podem aumentar os níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  no citosol. A homeostase da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  no citosol é mantida por meio da saída deste cátion para o meio extracelular realizada por um trocador  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$  e uma  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase da membrana plasmática (PMCA). Dentro da célula, o  $\text{Ca}^{2+}$  em excesso poderá ser acumulado pelo RE por meio da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase e pela mitocôndria.

Dentre os mecanismos responsáveis pelo tamponamento do cálcio citosólico, protegendo as células dos efeitos deletérios produzidos pela exposição prolongada de altas concentrações a esse íon, destacam-se a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do RE, que capta  $\text{Ca}^{2+}$  para o interior da organela, os mecanismos de efluxo presentes na membrana plasmática, como uma  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase e o trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , a captação mitocondrial ligação de  $\text{Ca}^{2+}$  com proteínas citoplasmáticas, como a calbindina (Carafoli, 1987; Gunter e Gunter, 1994).

A liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  pela mitocôndria pode ocorrer por meio de três vias diferentes. A primeira é a via dependente de  $\text{Na}^+$ , também conhecida como trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . Ela ocorre principalmente em mitocôndrias localizadas no coração, cérebro, músculo esquelético e tecido adiposo marrom (Baysal et al., 1994). A segunda via é independente de  $\text{Na}^+$  e é conhecida como trocador  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ . Esta ocorre predominante em fígado, rim, pulmão e músculo liso (Gunter e Gunter, 1994). A terceira via é um mecanismo inespecífico e caracterizado pela liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  provocada pela abertura de um poro na membrana interna da mitocôndria (Gunter et al., 2004).

### ***1.2. Transição de permeabilidade mitocondrial e morte celular***

O pioneiro trabalho de Hunter et al. (1976), onde trataram mitocôndrias isoladas com  $\text{Ca}^{2+}$ , propôs que o acúmulo mitocondrial deste cátion resultaria na permeabilização da organela devido à formação de um poro na membrana interna. Pelo fato deste processo ser parcialmente revertido através da remoção do  $\text{Ca}^{2+}$ , esse fenômeno foi denominado transição de permeabilidade mitocondrial (MPT) (Hunter e Haworth, 1979). De acordo com estes trabalhos, o  $\text{Ca}^{2+}$  induz uma mudança configuracional na mitocôndria que desacopla a fosforilação oxidativa e está associada a um inchamento da organela. Mais tarde, demonstrou-se que mitocôndrias isoladas tratadas com quantidades excessivas de  $\text{Ca}^{2+}$  sofriam uma permeabilização não-seletiva da membrana mitocondrial interna, tipicamente promovida por estresse oxidativo e acúmulo excessivo de  $\text{Ca}^{2+}$  na matriz mitocondrial (Kowaltowski et al., 2001) (**Figura 2**). Essa permeabilização resulta na perda do potencial de membrana, liberação do  $\text{Ca}^{2+}$  acumulado, entrada de sacarose na matriz e conseqüentemente inchamento coloidosmótico da organela.



**Figura 2** - A cadeia respiratória localizada na membrana mitocondrial interna gera constantemente o radical  $O_2^{\bullet-}$ . Este radical é removido pela Mn-superóxido dismutase MnSOD (na matriz) ou pela ZnCuSOD (no citosol), que promove a geração de  $H_2O_2$ . Na matriz o  $H_2O_2$  é detoxificado à  $H_2O$  pelas enzimas catalase (em mitocôndrias de coração e fígado), glutatona peroxidase (GPx) e tiorredoxina peroxidase (TPx). A redução do  $H_2O_2$  pela GPx e pela TPx ocorre às custas da oxidação da glutatona e tiorredoxina, respectivamente. Estas enzimas são reduzidas pela glutatona redutase (GR) e pela tiorredoxina redutase (TR) utilizando o NADPH como doador de elétrons. O  $NADP^+$  pode ser reduzido a NADPH pela NADP transidrogenase (TH), às custas da oxidação do NADH. Na presença de  $Fe^{2+}$ , o  $H_2O_2$  gera o radical  $OH^{\bullet}$  que pode oxidar grupos tióis de proteínas ou, ainda, promover a peroxidação de lipídeos da membrana mitocondrial (Kowaltowski et al., 2001).

Acredita-se que haja o envolvimento de um grupo de proteínas da membrana mitocondrial interna na formação do poro de MPT. Estas proteínas se agregariam em consequência de alterações estruturais (He e Lemasters, 2002), ou seja, o aumento das concentrações de  $Ca^{2+}$  e produção de EROs permitiriam a oxidação de resíduos de cisteína e formação de ligações cruzadas S-S (Fagian et al., 1990; Castilho et al., 1996), o que leva a

uma permeabilização não específica da membrana mitocondrial interna (Vercesi et al., 1997; Kowaltowski et al., 2001).

Alguns trabalhos confirmam que a MPT pode ser desencadeada pela adição de fontes exógenas de EROs (Frei et al., 1985; Hermes-Lima et al., 1991), e que a remoção de EROs por antioxidantes previne a oxidação de proteínas da membrana mitocondrial e a permeabilização da organela (Castilho et al. 1995; Kowaltowski et al., 1998; Santos et al., 1998).

A permeabilização da membrana mitocondrial interna é prevenida ou até revertida por redutores ditiólicos (Kowaltowski et al., 2001), adição de EGTA e inibida por quantidades micromolares de ciclosporina A (CsA) (Crompton et al., 1988), um ligante de ciclofilina D (CypD) e imunossupressor utilizado na clínica médica. Hoje é sabido que este processo pode ser inibido por outros compostos como sanglifehrin A, um outro ligante de CypD (Halestrap et al., 1997; Halestrap et al., 2002), ácido boncréico, ADP e ATP, ligantes do translocador de nucleodídeo de adenina (ANT) (Halestrap, 2004), bloqueadores do canal iônico voltagem dependente (VDAC) (Halestrap, 2006),  $Mg^{2+}$  e antioxidantes como catalase, glutatona e superóxido dismutase (Broekemeier et al., 1989; Zoratti e Szabo, 1995; Santos et al., 1998; Crompton 1999; Kowaltowski et al., 2001).

Até recentemente, tem se questionado a composição do poro de MPT. Através do uso de ligantes, foi possível evidenciar que o ANT participa da regulação do MPT, mas existe controvérsia se essa proteína também faz parte da composição do poro, ou apenas participa de sua regulação (Kowaltowski et al., 2001; Kim et al., 2003; Leung e Halestrap, 2008). Outros trabalhos sugerem que pode ocorrer a formação do poro de MPT mesmo na ausência de VDAC ou CypD (Baines et al., 2005; Nakagawa et al., 2005; Crompton et al., 2002; Faustin et al., 2004), mas nestas condições maiores concentrações de  $Ca^{2+}$  são necessárias. Além destes, a creatina quinase e a hexoquinase têm sido descritas como componentes do poro de MPT (Crompton et al., 1998; Beutner et al., 1996). Embora a exata composição do poro de MPT ainda permaneça em debate, há um consenso que a sua

abertura sustentada esteja relacionada com a morte celular (Crompton et al., 2000; Kowaltowski et al., 2001).

A impermeabilidade seletiva da membrana mitocondrial interna é essencial para a manutenção do potencial de membrana e do gradiente de prótons, requisitos para a síntese de ATP durante a fosforilação oxidativa. Quando esta barreira de permeabilidade é rompida pela abertura do MPT, as mitocôndrias tornam-se desacopladas e a ATPase translocadora de prótons hidrolisa ativamente o ATP, ao invés de sintetizá-lo. Se este evento ocorre em uma célula, as concentrações de ATP não poderão ser mantidas, mesmo pela glicólise e, a menos que o poro de MPT se feche novamente, a célula morrerá, pois o dano aos componentes celulares causado por hipóxia e estresse oxidativo só podem ser reparados se o ATP estiver disponível. Assim, a MPT representa um mecanismo pelo qual a morte celular por necrose pode ser iniciada (Halestrap et al., 2002; Vercesi et al., 2006).

Além de levar à morte celular por necrose, a permeabilização da membrana mitocondrial também pode resultar em apoptose (Crompton, 1999; Kroemer et al., 2007). A apoptose é um processo vital que ocorre constantemente nos organismos, de forma ativa e fisiológica, necessária à manutenção celular do organismo (Kroemer et al., 2007). Contudo, a apoptose também ocorre durante estados patológicos como em doenças neurodegenerativas e neuromusculares (Smaili et al., 2003; Kroemer et al., 2007).

Em geral, a apoptose envolve a participação da mitocôndria (via intrínseca) ou é disparada pela ativação de receptores de morte localizados na membrana plasmática (via extrínseca), onde ambas as vias envolvem a estimulação de uma cascata de eventos intracelulares que culminam com a morte das células (Kroemer et al., 2007). O processo apoptótico na via intrínseca é resultado de cascatas de eventos intracelulares nas quais a permeabilização da membrana mitocondrial interna tem um papel fundamental. Ocorre de maneira regulada e dependente de energia, quando a mitocôndria libera proteínas pró-apoptóticas, como citocromo c, fator indutor de apoptose (AIF) e pró-caspases (Green e Reed, 1998; Liu et al., 1996; Susin et al., 1999).

O citocromo *c*, normalmente localizado no espaço intermembranas mitocondrial, pode ser liberado para o citosol, onde se liga a Apaf-1 (“apoptosis activating factor 1”) e pró-caspase 9, formando o apoptosomo, complexo de alto peso molecular responsável pela clivagem de pró-caspase-9 (Zou et al., 1999). É interessante notar que a pró-caspase 9 também está localizada no espaço intermembranas mitocondrial, assim como uma fração das pró-caspases 2 e 3 (Krajewski et al., 1999, Ravagnan et al., 2002). As mitocôndrias também contêm a proteína Smac/DIABLO que inativa um grupo de proteínas citosólicas responsáveis pela inibição de caspases (Du et al., 2000, Verhagen et al., 2000). Finalmente, o AIF (“apoptosis inducing factor”) (Susin et al., 1999), uma proteína capaz de induzir condensação da cromatina nuclear de modo independente da ativação de caspases, e a endonuclease G (Parrish et al., 2001) são capazes de promover diretamente a fragmentação de DNA nuclear, e estão normalmente localizados no espaço intermembranas mitocondrial e migram para o citosol mediante estímulos pró-apoptóticos (Kroemer et al., 2007).

A apoptose é iniciada quando as proteínas participantes deste processo são liberadas do espaço intermembranas desta organela para o citosol. Três cenários diferentes tem sido descritos para esse evento: (i) A MPT precede a translocação da proteína pró-apoptótica Bax do citosol (Smaili et al., 2001), (ii) A MPT ocorre após a ativação da Bax e translocação desta do citosol para a mitocôndria (Tafani et al., 2001), (iii) A permeabilização da membrana externa ocorre independentemente da permeabilização na membrana interna, com a participação de Bax e/ou Bak e canais na membrana externa (Piret et al., 2004).

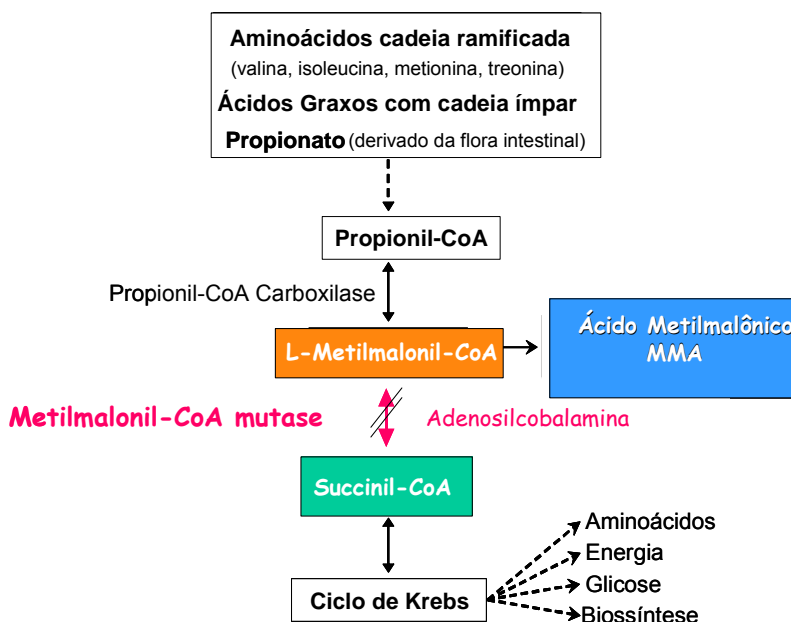
Vários autores têm proposto que a intensidade do insulto e duração da abertura do MPT e nível de ATP pode determinar o modo de morte da célula, se apoptose ou necrose. A abertura transiente do poro de MPT pode ser fisiológica e insuficiente para desencadear a morte celular (Petronilli et al., 1999). Em contraste, após a diminuição inicial dos níveis de ATP, uma prolongada abertura do poro de MPT pode ser letal. A manutenção dos altos níveis de ATP intracelular podem orientar a favor da apoptose. Entretanto os baixos níveis pode orientar a morte via necrose (Lemasters et al., 1998; Halestrap, 2005).

### ***1.3. Acidemia metilmalônica (MMAemia)***

A acidemia metilmalônica faz parte de um grupo de doenças inatas metabólicas causada pela deficiência funcional da enzima metilmalnonil-CoA mutase (MCM, EC 5.4.99.2), presente na matriz mitocondrial ou defeito na síntese de 5-deoksiadenosilcobalamina (AdoCbl, vitamina B<sub>12</sub>), cofator essencial a esta reação. A deficiência na atividade da MCM (**Figura 3**), que fisiologicamente catalisa a isomerização de L-metilmalonil-CoA a succinil-CoA durante o metabolismo normal de aminoácidos de cadeia ramificada (isoleucina, valina, metionina e treonina), colesterol, ácidos graxos de cadeia ímpar de carbonos e degradação do propionato, leva ao acúmulo primário de metilmalonil-CoA e, secundariamente, ao acúmulo de outros metabólitos, como metilmalonato, propionato, 3-hidroxipropionato, 2-metilcitrato e cetonas de cadeia longa (Fenton et al., 2001; Okun et al., 2002; Kolker et al., 2003).

A MMAemia é caracterizada pelo acúmulo de ácido metilmalônico (MMA) nos tecidos e fluidos corpóreos (Fenton et al., 2001). Sabe-se que o MMA compromete o metabolismo energético mitocondrial resultando em degeneração estriatal, convulsões e outras alterações neurológicas. No entanto, existe um debate a respeito de como este fenômeno ocorre.





**Figura 3** - Alteração do metabolismo de aminoácidos, ácidos graxos e propionato com acúmulo de MMA no sangue e fluidos corpóreos na deficiência de L-metilmalonil-CoA mutase (Adaptado de Chandler e Venditti, 2005).

#### ***1.4. Aspectos genéticos da acidemia metilmalônica***

Apesar de serem eventos raros, os erros orgânicos representam um problema importante e seu diagnóstico, freqüentemente, se constitui em desafio para o clínico. No entanto, em função dos diagnósticos clínicos mais apurados, evidenciou-se que as acidemias orgânicas são realmente os erros mais freqüentes na população (Wajner et al, 2002).

Oito tipos de deficiência foram descritos, baseados na bioquímica e estudo de células somáticas (Chandler e Venditti, 2005). Os defeitos na enzima MCM são divididos em dois tipos: mut<sup>o</sup> ou mut-, baseado na deficiência funcional completa ou parcial da

apoenzima. Pacientes com a mutação mut<sup>o</sup> apresentam uma forma mais severa da doença e não respondem aos tratamentos com vitamina B<sub>12</sub>. Os outros seis tipos de deficiência estão associados ao defeito no metabolismo da coenzima 5-deoksiadenosilcobalamina (AdoCbl) e podem responder parcialmente ao tratamento com vitamina B<sub>12</sub>. Neste caso, a doença é classificada de acordo com a complementação do grupo: CblA, causada pela mutação no gene MMAA no cromossomo 4q31 e CblB, causada pela mutação do gene MMAB no 12q24. O grupo CblH pode ser um subtipo do grupo CblA, onde a mutação no gene MMAA é causada no cromossomo 6p (Chandler e Venditti, 2005).

Dessa forma, as diferentes expressões da acidemia metilmalônica incluem: (i) ausência de MCM, (ii) redução da atividade de MCM, (iii) deficiência de síntese de 5'-deoksiadenosilcobalamina, (iv) falha do metabolismo de cobalamina e, possivelmente, (v) falta de oxigenação adequada para a metabolização de succinil CoA (Sweetman e Williams, 2001).

### ***1.5. Epidemiologia e sintomatologia da acidemia metilmalônica***

A incidência da doença é de 1:48.000 recém-nascidos nos EUA, constituindo uma das acidemias orgânicas mais frequentes (Coulombe et al., 1981).

Nas crianças com acidemia metilmalônica, o dano cerebral se inicia logo após o início da ingestão de proteínas. Quando o quadro se instala precocemente (até 21 dias), o paciente geralmente vai a óbito e as que sobrevivem apresentam retardo mental e outras anormalidades neurológicas, além de coma e convulsões (Roodhooft et al., 1990; Brismar e Ozand, 1994), episódios epiléticos, isquemia cerebral e complicações renais (Baumgartner e Viardot, 1995; Morath et al., 2007). Além disso, o tônus muscular apresenta-se comprometido e a hipotonia se acentua após as crises de descompensação metabólica (Fenton et al., 2001). Na acidemia metilmalônica observa-se acidose metabólica, hipercetonemia, hiperamonemia, hipoglicemia, neutropenia e trombocitopenia (Fenton et al., 2001). Não é possível de se explicar a acidose metabólica somente pelo acúmulo de

MMA. A presença de outros metabólitos, como o ácido láctico, pode contribuir para a acidose metabólica observada na acidemia metilmalônica.

O diagnóstico laboratorial pode ser realizado através do teste da p-nitroanilina para sangue e urina, sendo que o resultado positivo indica a possibilidade de acidemia metilmalônica e deve ser confirmado através da cromatografia gasosa, preferivelmente acoplada à espectrometria de massa (Fenton et al., 2001; Wajner et al., 2002).

### ***1.6. Neuropatologia da acidemia metilmalônica***

O acúmulo de ácido metilmalônico é tóxico para células de vários tecidos, incluindo neurônios e células da glia. A neuropatologia na acidemia metilmalônica é caracterizada principalmente por lesão irreversível dos núcleos caudado e putamen, dilatação dos ventrículos laterais e atrofia cortical revelados por exames de ressonância nuclear magnética (Twomey et al, 2003). Os pacientes podem apresentar alterações morfológicas no sistema nervoso central, como edema da substância branca nas primeiras semanas, podendo evoluir para um aumento no volume ventricular e desmielização até a degeneração dos gânglios da base, característica da doença (Kanaumi et al., 2006; Larnaout et al., 1998).

As concentrações plasmáticas de MMA, que são quase indetectáveis em indivíduos normais, podem estar entre 0,22 a 2,9 mM em pacientes (Fenton et al., 2001). O nível de MMA no sangue e no líquido cerebrospinal pode atingir 2,5 a 5 mM durante as crises de descompensação metabólica e estes níveis podem aumentar ainda mais nas células neuronais (Hoffmann et al., 1993). O acúmulo de MMA no SNC pode ter origem local ou sistêmica, no caso de haver comprometimento da barreira hemato-encefálica (BHE) (Kolker et al, 2006). Apesar da produção de MMA no SNC ser provavelmente baixa, a BHE propiciaria o seu acúmulo neste sistema (Kolker et al., 2006).

### ***1.7. Tratamento na acidemia metilmalônica***

O tratamento dos pacientes portadores de acidemia metilmalônica inclui medidas terapêuticas como: i) remoção de toxinas através de transfusões de sangue ou hemodálises; ii) restrição protéica (dieta isenta de aminoácidos valina, isoleucina, leucina, metionina e treonina); iii) terapia com vitamina B<sub>12</sub>, nas acidemias metilmalônicas por deficiência de cofator (Orgier de Baulny e Saudubray, 2002); iv) administração de L-carnitina, propiciando a excreção urinária de propionil-carnitina, e redução da toxicidade do propionato (Burns et al. 1996); v) administração de ascorbato para diminuir os efeitos da deficiência de glutatona (Treacy et al., 1996). Os pacientes mut-, normalmente respondem melhor ao tratamento, enquanto os pacientes mut<sup>o</sup> apresentam um prognóstico menos favorável. Até o momento nenhuma terapia específica e efetiva foi desenvolvida para proteger o cérebro dos danos causados por essa doença.

### ***1.8. Disfunção mitocondrial na acidemia metilmalônica***

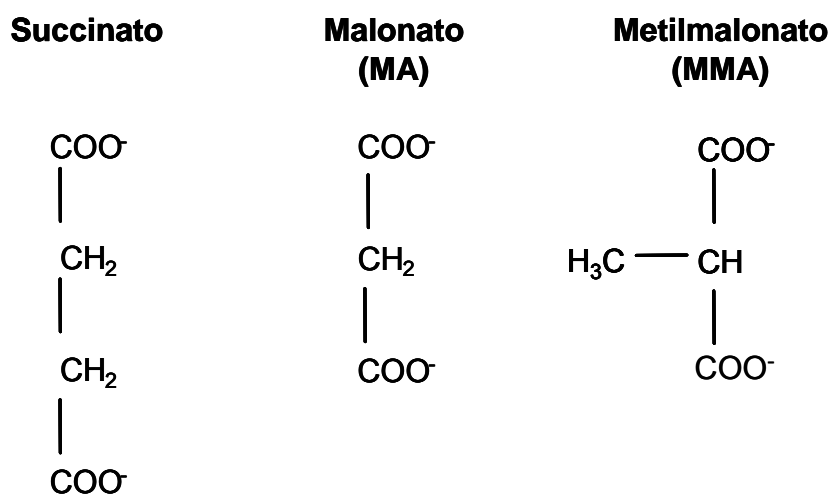
Muitas evidências sugerem que o MMA compromete a função mitocondrial, já que experimentos *in vitro* e *ex vivo* mostraram que o MMA diminui os níveis de ATP (McLaughlin et al., 1998), a produção de CO<sub>2</sub> (Wajner et al., 2002), o consumo de O<sub>2</sub> mantido por succinato (Kowaltowski et al 2006; Maciel et al 2004; Toyoshima et al 1995) e aumenta a produção de lactato (Royes et al., 2003; Saad et al., 2006). Este aumento de lactato pode contribuir para o dano cerebral, uma vez que, seu acúmulo e o aumento na pCO<sub>2</sub> tecidual podem provocar acidose grave.

Além disso, de acordo com Halperin et al. (1971), durante as crises encefalopáticas agudas a inibição da gliconeogênese, causada pela inibição do carreador de malato resulta em hipoglicemia, sendo esta isquemia metabólica outra evidência de que o MMA compromete a função mitocondrial.

Foi demonstrado que o MMA induz a formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico *in vitro* e reduz a capacidade antioxidante total do sistema nervoso, pela

formação de radicais livres (Fontella et al., 2000), além de alterar a atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPases em estriado e córtex cerebral de ratos (Mafaltti et al., 2003). A administração intraestriatal de MMA causa convulsões e rotações contralaterais em ratos adultos, atenuadas pela administração de succinato e antioxidantes como a vitamina C e a vitamina E (de Mello et al., 1996; Fighera et al., 1999).

Segundo a literatura, há controvérsias em relação ao papel do MMA na atividade da SDH. Alguns grupos acreditam que o MMA atua como um fraco inibidor competitivo da SDH em cérebro e fígado de rato, provavelmente devido à sua similaridade estrutural com malonato (MA) (**Figura 4**), inibidor clássico da SDH, e succinato, substrato da mesma (Dutra et al 1993; Toyoshima et al 1995). Entretanto, publicações recentes mostram que MMA, em concentrações milimolares, não inibe a atividade de SDH estimada em partículas submitocondriais de coração de boi (Okun et al 2002; Kolker et al 2003) ou quando altas concentrações de succinato foram usadas no meio para medir esta atividade enzimática (Brusque et al 2002; Pettenuzzo et al 2006).



**Figura 4** – Estruturas químicas de succinato, malonato (MA) e metilmalonato (MMA).

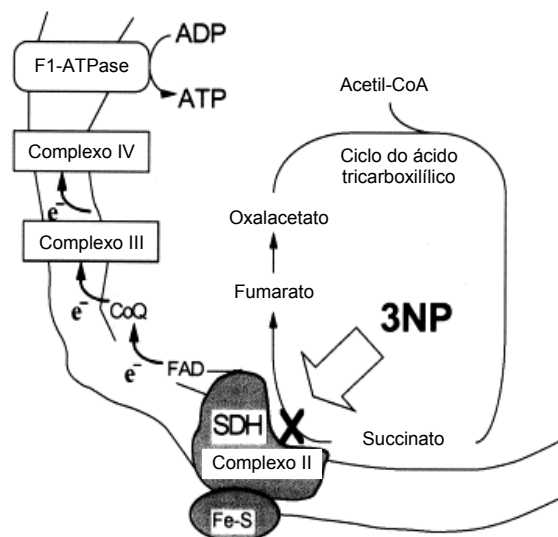
Outra hipótese é que o MMA não seja a principal neurotoxina na acidemia metilmalônica, mas que seus efeitos sejam resultado da formação intracelular de malonato e 2-metilcitrato a partir de MMA (Kolker e Okun 2005; Kolker et al 2003; Okun et al 2002). No entanto, a clivagem do grupo metil do MMA por esterases é pouco provável e a quantidade de MA encontrada após incubação de células com MMA foi muito baixa (Okun et al., 2002).

Assim, atualmente há um intenso debate a respeito de como o MMA prejudica a bioenergética mitocondrial e, mais particularmente a atividade do complexo II (SDH) da cadeia respiratória.

### ***1.9. Neurodegeneração induzido pelo ácido 3-nitropropiónico (3-NP)***

O ácido 3-nitropropiónico (3-NP) é uma toxina natural produzida por algumas plantas e fungos (Alston et al., 1977). O primeiro relato da intoxicação humana por 3-NP ocorreu pela ingestão de fungos presentes na cana-de-açúcar (Ludolph et al., 1991). O mecanismo celular da toxicidade do 3-NP não está completamente entendido. Sabe-se que a sua toxicidade pode ser irreversível, pois ele se liga covalentemente à subunidade de 70 kDa da succinato desidrogenase (SDH) e inibe a atividade desta enzima (Alston et al., 1977; Coles et al., 1979; Huang et al., 2006).

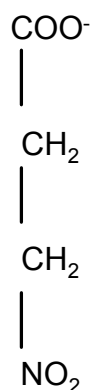
A SDH é responsável pela oxidação do succinato a fumarato no complexo II da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (Devlin, 2003). Além de bloquear a cadeia respiratória, o 3-NP bloqueia também o ciclo do ácido tricarboxílico (**Figura 5**), diminuindo a capacidade deste em produzir NADH disponível para o complexo I.



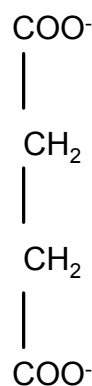
**Figura 5** - Esquema representando a ação do 3-NP tanto sobre a cadeia respiratória, inibindo a enzima do complexo II, a succinato desidrogenase (SDH), quanto sobre o ciclo do ácido tricarboxílico, que tem seu funcionamento bloqueado. CoQ – transportador de elétrons não protéico; FAD – flavoproteína capaz de promover oxidação e redução na cadeia respiratória; FeS – ligação dissulfeto presente no complexo II da cadeia respiratória mitocondrial (Adaptado de Brouillet et al., 1999).

A estrutura química do 3-NP é similar a do ácido succínico (substrato da SDH), o que pode explicar o fato do 3-NP ocupar o sítio catalítico da enzima e inativá-la irreversivelmente (**Figura 6**). Este processo ocorre pela ligação da SDH com o 3-NP na sua forma aniônica que, posteriormente, adquire a forma nitroacetilada. O 3-NP na sua nova estrutura conformacional reage com o grupo tiol da SDH mantendo-se ligada a ela covalentemente, impedindo o acesso do ácido succínico à enzima (Coles et al., 1979).

**3-Nitropropionato  
(3-NP)**



**Succinato**



**Figura 6** – A estrutura química do 3-NP é extremamente parecida com a do succinato, substrato natural da enzima, o que pode explicar o fato do 3-NP ocupar o mesmo sítio catalítico na succinato desidrogenase (SDH).

Como consequência da inibição da SDH pelo 3-NP, a redução da fosforilação oxidativa mitocondrial e falta de substrato para a glicólise levam a um rápido declínio e quase completa perda do ATP tecidual (Nordstrom e Siesjo, 1978). A consequente queda do potencial de membrana provoca a perda do bloqueio por  $\text{Mg}^{2+}$  do canal receptor glutamatérgico NMDA. Isso promove a ativação excessiva do receptor NMDA, mesmo na presença de concentrações normais de glutamato, fazendo com que ocorra uma entrada massiva de  $\text{Ca}^{2+}$  do meio extracelular para o citosol, podendo levar à lesão e morte celular (Coyle e Puttfarcken, 1993; Castilho et al., 1998; Brouillet et al., 1999).

Devido à excessiva estimulação dos receptores NMDA e despolarização de neurônios, os níveis de glutamato, na fenda sináptica, atingem valores elevados, e os neurônios respondem a esse neurotransmissor em duas etapas. Primeiramente, após alguns minutos de exposição, eles despolarizam-se, na dependência da presença de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , refletindo o influxo de  $\text{Na}^+$ , acompanhado passivamente pelo influxo de  $\text{Cl}^-$  e água, resultando no aumento do volume celular. Porém não é um evento letal, pois a maioria das células recupera seu volume homeostático e sobrevive. Secundariamente, após algumas



horas de exposição, a neurotoxicidade do glutamato leva à desintegração neuronal tardia, mediada pelo influxo excessivo de  $\text{Ca}^{2+}$ . A dependência de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular e hiperativação de receptores NMDA apóiam a hipótese de que a excitotoxicidade tardia é mediada pelo influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e pode ser sistematizada em 3 estágios: indução, amplificação e expressão (Choi, 1992).

A fase de indução é representada pela ativação de receptores neuronais por glutamato, aumentando os níveis citoplasmáticos de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ , água,  $\text{IP}_3$  e diacilglicerol, atuantes em eventos posteriores. A amplificação por sua vez, caracteriza-se por acentuar as alterações iônicas, em especial os níveis de  $\text{Ca}^{2+}$ , incluindo agora os armazenados intracelularmente, além da ativação de certas famílias de enzimas como proteína cinase C, enzimas reguladas por calmodulinas, calpaínas e fosfolipases. Por último, a fase de expressão se iniciaria a partir do momento em que os níveis elevados de  $\text{Ca}^{2+}$  disparam uma gama de cascatas, atuantes tanto na excitotoxicidade imediata quanto tardia, onde os níveis elevados de  $\text{Ca}^{2+}$  podem ativar a protease calpaína que resultará na degradação de proteínas neuronais estruturais, ativar fosfolipases capazes de promover a lise da membrana celular e liberar ácido araquidônico e endonucleases (Choi, 1992; Orrenius et al., 2003).

Estudos demonstraram que o 3-NP penetra no cérebro inibindo a atividade da SDH dentro das primeiras 2 horas após a administração intraperitoneal e esta inibição significativa por pelo menos 24 horas (Brouillet et al., 2005). Além disso, as lesões estriatais induzidas pelo 3-NP, após intoxicação crônica com este inibidor, foram associadas com 50 – 60% de inibição da SDH, um nível um pouco acima da inibição do complexo II/III observada no núcleo caudado *post-mortem* de pacientes com a doença neurodegenerativa de Huntington (Brouillet et al., 2005). Apesar do estriado ser a região mais vulnerável às lesões induzidas pelo 3-NP (Brouillet et al., 1995), alguns trabalhos mostram que não apenas neurônios são afetados, mas também a glia. De fato, os astócitos são mais vulneráveis ao 3-NP e apresentam maior índice de apoptose do que os neurônios (Fukuda et al., 1998). Alterações em astrócitos podem levar a distúrbios na interação neurônio-glia e, conseqüentemente, a modificações da homeostase iônica (Deitmer, 2001).

Evidências recentes implicam a participação da MPT na neurodegeneração induzida por 3-NP (Keller et al., 1998; Leventhal et al. 2000; Maciel et al., 2004; Rosenstock et al., 2004; Ruan et al., 2004). Nosso grupo demonstrou que a adição de 3-NP a mitocôndrias cerebrais carregadas com  $\text{Ca}^{2+}$  induz inchamento mitocondrial e queda do potencial elétrico transmembrana devido à MPT (Maciel et al., 2004). Leventhal et al. (2000) mostraram que o tratamento sistêmico de ratos com ciclosporina A, um inibidor da MPT, resulta em proteção da lesão estriatal induzida pela administração crônica de 3-NP. Rosenstock et al (2004) obtiveram evidências da ocorrência de MPT em astrócitos intactos tratados com 3-NP. Células PC12, expressando presenilina-1 mutada (Keller et al., 1998) e células estriatais com mutação em huntingtina (Ruan et al., 2004) também apresentaram MPT quando tratadas com 3-NP.

O 3-NP, além do efeito neurotóxico (Beal et al., 1993; Brouillet et al., 2005), também apresenta efeito tóxico em cardiomiócitos. Esta toxicidade provoca trombose atrial, necrose, perda celular e fibrilação, num processo associado com inibição significativa da atividade da SDH e diminuição dos níveis de ATP no coração (Gabrielson et al., 2001).

## *2. Objetivos*

## **2.1. Objetivo geral:**

É proposto que a neurodegeneração na acidemia metilmalônica e na doença de Huntington seja decorrente de um comprometimento do metabolismo energético mitocondrial e de estresse oxidativo. Diante disso, o objetivo desse trabalho foi estudar a disfunção mitocondrial causada por metilmalonato (MMA) e 3-nitropropionato (3-NP). Enquanto o MMA é acumulado nas crises metabólicas da acidemia metilmalônica (Fenton et al., 2001), o 3-NP é um inibidor irreversível da SDH e provoca neurodegeneração semelhante à observada na doença de Huntington, quando administrado sistemicamente (Brouillet et al., 2005).

## **2.2. Objetivos específicos:**

- a)** Caracterizar o efeito *in vitro* de MMA na atividade da lactato desidrogenase (LDH).
- b)** Estudar o efeito de MMA na oxidação de substratos respiratórios por mitocôndrias isoladas.
- c)** Caracterizar a transição de permeabilidade mitocondrial (MPT) induzida pelo inibidor da succinato desidrogenase 3-NP.

### *3. Materiais e Métodos*

**3.1. Reagentes** – A maioria dos produtos químicos, incluindo ácido ascórbico, ácido butilmalônico (99%), ácido glutâmico, ácido  $\alpha$ -cetoglutárico, ácido glutárico, ácido láctico, ácido málico, ácido malônico ( $\geq 97\%$ ), ácido metilmalônico ( $\geq 99\%$ ), ácido pirúvico, ácido succínico, ácido 3-nitropropiónico ( $\geq 97\%$ ), ADP, ATP, antimicina A, alameticina, ciclosporina A (CsA), 2,6 diclorofenolindolifenol (DCPIP), digitonina, fenazina metassulfato (PMS), dinucleotídeo de nicotinamida adenina ( $\text{NAD}^+$ ), dinucleotídeo de nicotinamida adenina reduzido (NADH), *N,N,N',N'*-tetrametil-p-fenilendiamina (TMPD), oligomicina e rotenona foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). As soluções de butilmalonato (BtMA), malonato (MA), metilmalonato (MMA) e 3-nitropropionato (3-NP) foram preparados por dissolução dos respectivos ácidos em água e o pH foi ajustado a 7,2 com NaOH (Figuras 7 - 9, 15, 16) ou KOH (Figuras 10 - 14, 17 - 22), dependendo do ensaio feito.  $\text{CaCl}_2$  foi adquirido da Merck (Darmstadt, Germany) e os outros reagentes utilizados nos experimentos desta tese foram de alto grau de pureza.

**3.2. Animais de experimentação** – Os procedimentos experimentais utilizados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA), FCM/UNICAMP, por estarem de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (protocolo nº 697-1 de 2004). Foram utilizados ratos da linhagem *Wistar*, fêmeas, adultos, pesando 250 - 300 g, obtidos no biotério central da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB - Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica). Os animais foram alojados em gaiolas mantidas em sala climatizada a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , com ciclo de 12 horas claro e escuro, com livre acesso a água e ração (Labina/Purina, Campinas, SP, Brasil).

**3.3. Homogenatos de fígado e cérebro** – Ratos foram sacrificados por deslocamento cervical. Cérebro e fígado foram rapidamente removidos (aproximadamente 2 minutos) e separadamente imersos em solução de manitol 225 mM, sacarose 75 mM, EGTA- $\text{Na}^+$  1 mM, HEPES- $\text{Na}^+$  5 mM (pH 7,2) e BSA 0,1%, pH 7,2, mantida em banho de gelo. Cerebelo e medula foram cuidadosamente removidos e descartados. Cérebro total resultante e fígado foram cortados em pequenos fragmentos, lavados nesta solução repetidamente e homogeneizados manualmente em homogeneizador do tipo *Dounce*. Os homogenatos de cérebro e fígado foram centrifugados por 3 minutos a 2.000 g. Após esta primeira

centrifugação, o sobrenadante foi recentrifugado por 10 minutos a 8.000 *g* em rotor Beckman 25.50 JA (Beckman, Palo Alto, CA, USA). Os sobrenadantes da segunda centrifugação (homogenatos) foram usados numa concentração de 5 - 8 mg  $\times$  mL<sup>-1</sup> proteína. Foram utilizadas duas centrifugações com a finalidade de obtermos um homogenato com frações ricas de componentes citosólicos e poucos componentes intracelulares mais pesados, como núcleo e mitocôndrias.

**3.4. Tratamento *in vivo* com 3-NP** – 3-NP ou PBS foram administrados *i.p.*, na dose de 25 mg  $\times$  kg<sup>-1</sup> peso corporal e após 24 horas os animais foram sacrificados. Cerebelo, córtex, estriado, coração, fígado e rim foram rapidamente removidos, lavados com solução de manitol 225 mM, sacarose 75 mM e HEPES-K<sup>+</sup> 5 mM pH 7,2, congelados em tubos *eppendorfes* com N<sub>2</sub> líquido e estocados a -80°C. Posteriormente, cada amostra foi descongelada num recipiente com 10 mL deste mesmo meio de isolamento, mantido em banho de gelo e os tecidos foram cortados em pequenos pedaços. Os fragmentos foram homogeneizados manualmente em homogeneizador tipo *Dounce* por aproximadamente dez vezes. Ajustou-se a concentração de proteína para 10 - 15 mg  $\times$  mL<sup>-1</sup>.

**3.5. Isolamento das frações mitocondriais** – Cérebros de dois ou três animais foram rapidamente removidos (1 minuto). No isolamento de mitocôndrias de cérebro total foram descartados cerebelo e medula. Para o isolamento das mitocôndrias de cérebro total ou das sub-regiões cerebrais (cerebelo, córtex e estriado) foi utilizado o método de centrifugação diferencial descrito por Rosenthal et al. (1987) com algumas modificações. O tecido cerebral foi removido e colocado num recipiente com 10 mL de meio de isolamento contendo manitol 225 mM, sacarose 75 mM, EGTA-K<sup>+</sup> 1 mM, BSA 0,1% e HEPES-K<sup>+</sup> 10 mM (pH 7,4). Foram cortados em pequenos pedaços e extensivamente lavados. Estes fragmentos foram homogeneizados manualmente em homogeneizador tipo *Dounce* por aproximadamente 6 vezes com pistilo frouxo e 8 vezes com o pistilo apertado para provocar a lise celular e obtenção de uma suspensão homogênea. A suspensão foi centrifugada por 3 min a 2.000 *g* em rotor Beckman 25.50 JA (Beckman, Palo Alto, CA, USA) para precipitação de núcleos e resíduos celulares. Após a primeira centrifugação, o sobrenadante foi novamente centrifugado por 8 minutos a 12.000 *g*. O sedimento resultante

foi ressuspensão em 20 mL do mesmo meio com adição de 40 µL de digitonina 10% e centrifugado durante 10 minutos a 12.000 g. O sobrenadante e o pellet mais externo e superior (parte clara) foram descartados e apenas o pellet central (escuro) foi ressuspensão em meio de manitol 225 mM, sacarose 75 mM e HEPES-K<sup>+</sup> 5 mM pH 7,2 e novamente centrifugado a 12.000 g por 10 min. Todas as centrifugações foram realizadas a 4°C. O sedimento foi ressuspensão em mesmo meio de reação, ajustando-se a concentração de proteína para 30 - 40 mg × mL<sup>-1</sup> e mantido em banho de gelo. Foram utilizadas somente preparações que apresentaram coeficiente de controle respiratório (CR) acima de 5,0, utilizando malato 5 mM e glutamato 5 mM como substratos.

Nos isolamentos das mitocôndrias de fígado e rim foram utilizados o método de centrifugação diferencial de Schneider e Hogeboom (1951) com algumas modificações. Fígado e rins foram imediatamente retirados, imersos em 10 mL de solução de sacarose 250 mM, EGTA-K<sup>+</sup> 0,5 mM e HEPES-K<sup>+</sup> 10 mM pH 7,2, mantidos em banho de gelo. Os tecidos foram cortados em pequenos fragmentos, extensivamente lavados e submetidos à ruptura física com homogeneizador tipo *Potter-Elvehjem* (10 vezes). As suspensões foram centrifugadas durante 10 minutos a 800 g em rotor Beckman 25.50 JA (Beckman, Palo Alto, CA, USA). Os sobrenadantes resultantes foram ressuspensos em 20 mL do mesmo meio com adição de 40 µL de digitonina 10% e centrifugados por 10 minutos a 6.800 g. Os sedimentos foram ressuspensos em solução de sacarose 250 mM, HEPES-K<sup>+</sup> 10 mM, pH 7,2 e EGTA-K<sup>+</sup> 0,3 mM e novamente centrifugados durante 10 minutos a 8.000 g. Todas as centrifugações foram realizadas a 4°C. As frações mitocondriais foram ressuspensas na mesma solução isenta de EGTA, obtendo-se uma concentração final de 75 - 80 mg proteína fígado × mL<sup>-1</sup> e 40 mg proteína rim × mL<sup>-1</sup>.

Para o isolamento das mitocôndrias de coração foi utilizado o método de centrifugação diferencial descrito por Vercesi et al. (1978), com algumas modificações. Dois corações foram rapidamente retirados e colocados em meio contendo manitol 210 mM, sacarose 75 mM, HEPES-K<sup>+</sup> 10 mM, pH 7,2, EGTA-K<sup>+</sup> 1 mM e BSA 0,1% em banho de gelo, onde foram cortados em pequenos pedaços e lavados. Os fragmentos foram submetidos à ruptura física, e homogeneizados manualmente 10 vezes com pistilo frouxo



e 10 vezes com o pistilo apertado. A suspensão foi centrifugada durante 10 minutos a 800 g em rotor Beckman 25.50 JA (Beckman, Palo Alto, CA, USA). O sobrenadante resultante foi ressuspenso em 20 mL do mesmo meio com adição de 40 µL de digitonina 10% e centrifugado por 10 minutos a 6.000 g. O sedimento foi ressuspenso em meio contendo manitol 210 mM, sacarose 75 mM e HEPES-K<sup>+</sup> 10 mM pH 7,2 e centrifugado na condição anterior. A fração mitocondrial foi ressuspensa na mesma solução numa concentração de 40 mg proteína x mL<sup>-1</sup>.

Mitocôndrias de músculo foram obtidas a partir de músculo esquelético de ratos adultos conforme descrito por Tonkonogi e Sahlin (1997), com algumas modificações. Após a dissecação, os músculos foram cortados em solução de sacarose 100 mM, KCl 100 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 mM, EGTA-K<sup>+</sup> 0,1 mM, BSA 0,2 % e tampão de Tris-HCl 50 mM, pH 7,4. Os fragmentos foram homogenizados 3 vezes em Politron (11.000 rpm) por 2 segundos e por 4 vezes em *Potter-Elvehjem*. Esta suspensão foi centrifugada durante 10 minutos a 700 g em rotor Beckman 25.50 JA (Beckman, Palo Alto, CA, USA). O sobrenadante resultante foi ressuspenso em 20 mL do mesmo meio com adição de 40 µL de digitonina 10% e centrifugado por 10 minutos a 10.000 g. O sedimento foi novamente centrifugado por 3 minutos a 6.000 g. A fração mitocondrial final foi ressuspensa em solução de sacarose 75 mM, manitol 225 mM, EDTA-K<sup>+</sup> 0,1 mM e Tris-HCl 10 mM pH 7,4 numa concentração de aproximadamente 30 mg proteína x mL<sup>-1</sup>.

Nos isolamentos de mitocôndrias de fígado, rim, coração e músculo, com a finalidade de estudar o efeito sinérgico entre Ca<sup>2+</sup> e 3-NP, acrescentamos 40 µL de digitonina 10% em todos os preparos. Esta adição foi realizada para descartarmos uma possível interferência da digitonina nos resultados obtidos com mitocôndrias de cérebro.

**3.6. Isolamento de Partícula Submitocondrial Invertida de Fígado** – Partículas invertidas (SMP) foram obtidas a partir de mitocôndrias isoladas de fígado de acordo com o método descrito por Harmon (1982) com algumas modificações. Mitocôndrias de fígado congeladas (- 80°C) a 80 mg x mL<sup>-1</sup> (4 mL) foram descongeladas, homogeneizadas e ressuspensas em 10 mL de solução contendo sacarose 250 mM e HEPES-K<sup>+</sup> 10 mM pH 7,4. Este volume foi centrifugado por 15 minutos a 27.000 g em rotor Beckman 25.50 JA

(Beckman, Palo Alto, CA, USA) e o sedimento mitocondrial foi ressuspensão em meio de sacarose 250 mM, HEPES-K<sup>+</sup> 10 mM e Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, pH 7,4 numa concentração aproximada de 30 mg × mL<sup>-1</sup>. Esta suspensão foi sonicada através de ultra-som com sonda de 3 mm a 30% da frequência máxima, 3 vezes por 30 segundos com intervalos de 1 minuto em banho de gelo. Posteriormente a suspensão foi centrifugada a 23.500 g por 10 minutos. O sobrenadante foi ultracentrifugado durante 30 minutos a 44.000 g em rotor Beckman 90 Ti (Beckman, Palo Alto, CA, USA). O sedimento foi ressuspensão em meio de sacarose 250 mM, HEPES-K<sup>+</sup> 10 mM, pH 7,4 e KCl 150 mM e centrifugado duas vezes nesta mesma condição. O sedimento foi ressuspensão em meio de sacarose 250 mM e HEPES-K<sup>+</sup> 10 mM e centrifugado novamente por 10 minutos a 15.000 g. O sobrenadante foi centrifugado por 25 minutos a 44.000 g. O pellet final (SMP) foi ressuspensão em solução de sacarose 250 mM e HEPES-K<sup>+</sup> 20 mM pH 7,4 e mantido em banho de gelo. Os preparos de SMP resultaram em mais de 85% de vesículas invertidas. A presença de vesículas não-invertidas foi avaliada pelo efeito da adição de citocromo *c* (5 µM) no consumo de O<sub>2</sub> mantido por NADH (Harmon, 1982).

**3.7. Determinação de Proteína** – As concentrações de proteína dos homogenatos e suspensões mitocondriais foram determinadas pelo método de Biureto (Gornall et al., 1949) na presença de colato 0,2%. O princípio do método baseia-se na formação de ligações peptídicas com íons cúpricos, em meio alcalino, dando origem a um complexo com tonalidade violeta, quantificado a 540 nm em espectrofotômetro. A absorbância é considerada diretamente proporcional à concentração de proteína na solução analisada. Uma solução de BSA a 1% foi utilizada como padrão.

**3.8. Medida da atividade da LDH** – Para avaliar a atividade enzimática da lactato desidrogenase na conversão de piruvato a lactato ou lactato a piruvato em homogenatos de cérebro e fígado, quantificou-se a fluorescência emitida pelo NADH. A fluorescência desse composto foi monitorada em fluorímetro Hitachi F-4010 (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan) em temperatura controlada de 37°C e comprimentos de ondas de 366 e 450 nm para excitação e emissão, respectivamente. As aberturas de fendas usadas nas reações de consumo e produção de NADH foram de 2,5 nm e 5 nm, respectivamente. Os experimentos foram

realizados em 2 mL de meio Tris-HCl 50 mM pH 7,4. Após 30 segundos de pré-incubação dos homogenatos (~20 µg) com piruvato (0,1 mM) ou lactato (2 mM), a reação foi iniciada pela adição de NADH 0,1 mM ou NAD<sup>+</sup> 0,8 mM para a conversão de piruvato a lactato ou lactato a piruvato, respectivamente. As reações foram paradas após 3 minutos. Diferentes concentrações de MMA estiveram presentes desde o período da pré-incubação. As taxas de produção ou consumo de NADH foram estimadas entre 10 e 40 segundos após adição de NAD<sup>+</sup> ou NADH, respectivamente.

**3.9. Medida da atividade da Succinato Desidrogenase (SDH)** – A determinação da atividade da SDH foi determinada pelo método de Singer (1974), utilizando-se 2,6-diclorofenolindolifenol (DCPIP) e fenazina metassulfato (PMS) como receptores artificiais de elétrons. O sistema foi monitorado colorimetricamente a 600 nm, em temperatura controlada de 37°C. Os experimentos foram realizados em volume final de 1 mL constituído de Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, succinato-Na<sup>+</sup> 1 mM, antimicina A 1 µM, KCN 1 mM, Triton X-100 1 %, PMS 1 mM e DCPIP 80 µM.

Para os experimentos da Figura 14, após 10 minutos de pré-incubação da suspensão mitocondrial com succinato (1 mM), metade da alíquota foi retirada (0,2 mg × mL<sup>-1</sup>), os reagentes necessários foram adicionados e a reação de atividade da SDH foi iniciada pelas adições de DCPIP 80 µM e PMS 1 mM. As concentrações de MMA ou MA estiveram presentes desde o período da pré-incubação. As reações foram paradas após 5 minutos e as taxas da atividade da SDH foram estimadas entre 100 e 200 segundos após as adições de DCPIP e PMS.

**3.10. Medida do consumo de oxigênio** – O consumo de O<sub>2</sub> em suspensões de mitocôndrias isoladas e SMP foi monitorado polarograficamente utilizando-se um eletrodo tipo Clark marca Hansatech com o uso do programa ao software OXIGRAPH V 1.10 (Hansatech Instruments Ltd England). Considerou-se que a solubilidade do O<sub>2</sub> em água é 200 µmoles × L<sup>-1</sup>, a 37°C e 1 atm (Robinson e Cooper, 1970). As suspensões foram adicionadas ao meio de reação contendo KCl 130 mM, HEPES-K<sup>+</sup> 10 mM pH 7,2, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM e EGTA 200 µM e mantidas em câmara de vidro fechada (1 mL), termostatizada a 37°C e sob agitação constante. A qualidade das mitocôndrias (CR) foi testada pelo cálculo da razão

entre as velocidades de consumo de  $O_2$  nos estados de fosforilação oxidativa (V3) e repouso (V4). A suspensão mitocondrial foi considerada adequada para o uso quando esta razão foi superior a 5,0 utilizando malato 5 mM e glutamato 5 mM como substratos.

**3.11. Potencial Elétrico de Membrana Mitocondrial ( $\Delta\Psi$ )** – O  $\Delta\Psi$  foi monitorado através da medida das alterações de fluorescência da safranina O na suspensão mitocondrial (Åkerman e Wikström, 1976). A safranina O é um cátion lipofílico que é acumulado por mitocôndrias em quantidades proporcionais ao potencial de membrana. O acúmulo da safranina no microambiente mitocondrial promove uma diminuição da fluorescência global da suspensão. As mitocôndrias foram adicionadas ao meio de reação a 37°C contendo KCl 130 mM, HEPES- $K^+$  10 mM,  $K_2HPO_4$  2 mM,  $MgCl_2$  1 mM, EGTA 30  $\mu$ M, pH 7,2, safranina O 5  $\mu$ M e succinato 5 mM. O desacoplador FCCP (1  $\mu$ M) foi utilizado para despolarizar a membrana mitocondrial interna. A análise foi realizada em espectrofotômetro de fluorescência F-4500 (Hitachi Ltd, Tóquio, Japão) operando nos comprimentos de onda de 495 nm (excitação) e 586 nm (emissão) com aberturas de fendas de 5 nm.

**3.12. Medida de inchamento mitocondrial** – Mudanças no espalhamento de luz da suspensão mitocondrial devido à entrada de íons  $K^+$  e o conseqüente inchamento das mitocôndrias (0,4 mg de proteína  $\times$  mL<sup>-1</sup>) foram acompanhados durante 20 minutos em um fluorímetro Hitachi 4010 com temperatura controlada de 37°C em comprimentos de onda de excitação e emissão 540 nm, sob agitação constante (Beavis et al., 1985). O experimento foi finalizado pela adição de alameticina (40  $\mu$ g  $\times$  mg de proteína<sup>-1</sup>) para induzir o máximo inchamento em toda a população mitocondrial.

**3.13. Análise estatística** – As análises estatísticas foram determinadas utilizando-se o software OriginPro 7.5. Os dados experimentais foram expressos como sendo a média dos valores  $\pm$  desvio ou erro padrão da média (média  $\pm$  d.p. ou média  $\pm$  e.p.m., respectivamente), submetidos à análise de variância (ANOVA) seguido pelo pós-teste de Tukey para comparações múltiplas e teste t de Student quando apenas um parâmetro foi comparado entre dois grupos. Todas as figuras apresentadas nos resultados são

representativas de pelo menos quatro experimentos independentes.  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$  foram considerados significantes.

## 4. *Resultados*

#### 4.1. Parte A: Efeito *in vitro* de Metilmalonato (MMA) na Atividade da Lactato Desidrogenase (LDH).

A MMAemia é caracterizada por dano tecidual generalizado com efeitos no cérebro, possivelmente pelo acúmulo de altos níveis de MMA ou pela grande dependência do metabolismo aeróbico neste tecido (Wajner e Coelho, 1997). No entanto, as concentrações de MMA acumuladas nos tecidos e fluidos corpóreos não explicam a acidemia observada em pacientes (Fenton et al., 2001), sugerindo o envolvimento de outros processos metabólicos nesta alteração.

A enzima LDH catalisa a conversão de piruvato, um produto da glicólise, a lactato. Num estudo recente (Maciel et al., 2004), utilizando avaliações da atividade desta enzima como marcador de morte celular em microfatias de cérebro expostos ao MMA, nosso grupo obteve a primeira evidência da inibição da LDH pelo MMA. A partir destes resultados e devido à importância da LDH no metabolismo celular, na primeira parte desta tese investigou-se o efeito do MMA na atividade enzimática da LDH. Para esta análise, foram avaliadas tanto a conversão de piruvato a lactato como a conversão de lactato a piruvato catalisada pela LDH em homogenatos de cérebro e fígado de ratos.

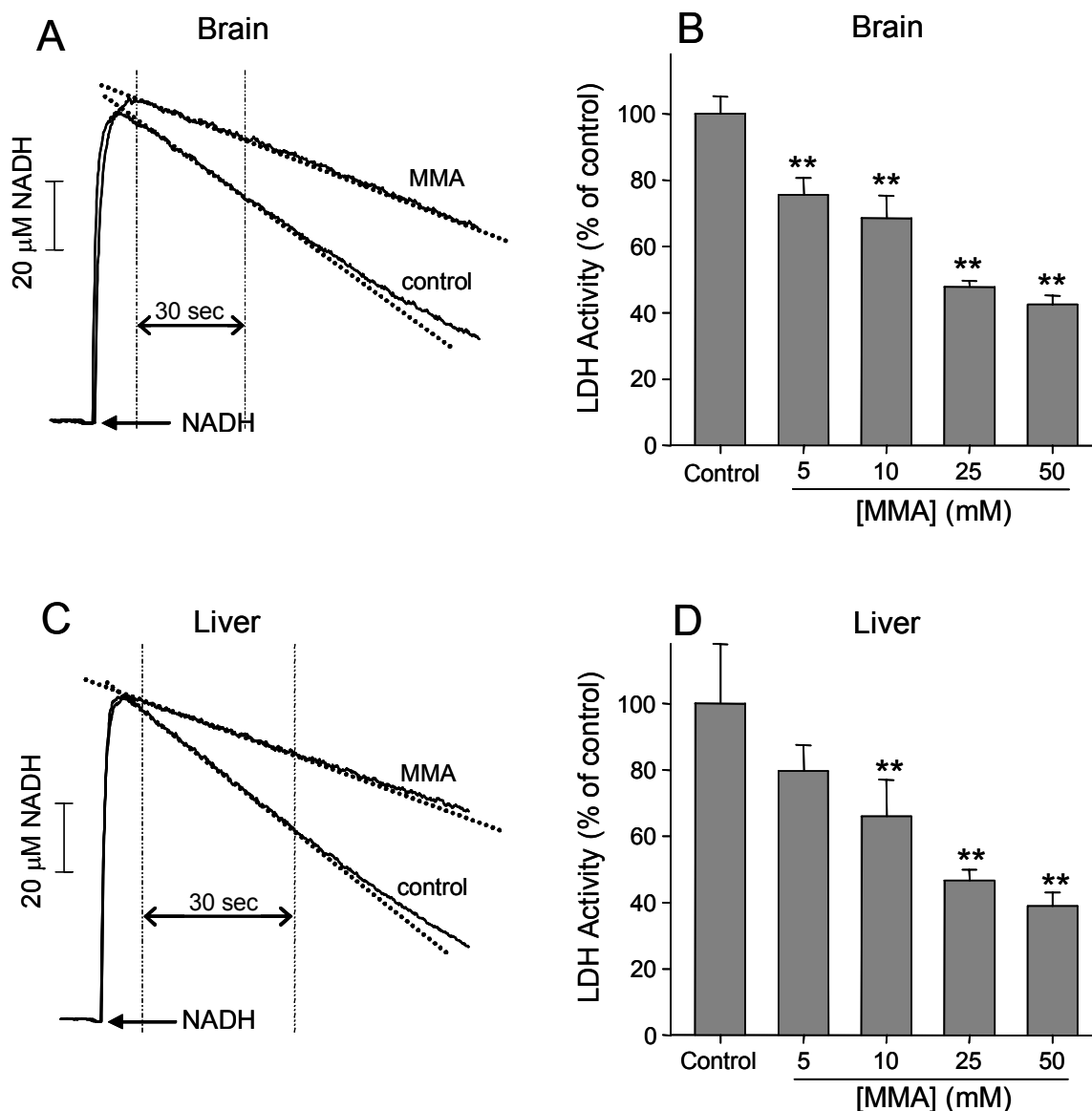
Na **figura 7** observou-se o efeito *in vitro* do MMA, em concentrações variando de 5 a 50 mM, na conversão de piruvato a lactato pela enzima LDH em homogenatos de cérebro (**Painéis A e B**) e fígado de ratos adultos (**Painéis C e D**). Os **Painéis A e C** mostram traçados representativos da atividade da LDH na conversão de piruvato a lactato em homogenatos de cérebro e fígado, respectivamente.

Para avaliar a conversão de piruvato a lactato pela enzima LDH os experimentos foram realizados a 37°C em cubeta sob agitação magnética constante, em meio de reação de Tris-HCl 50 mM pH 7,4, contendo piruvato- $\text{Na}^+$  0,1 mM e diferentes concentrações de MMA, como indicado nos painéis. As reações foram iniciadas pela adição de NADH 0,1 mM após 30 segundos de pré-incubação dos homogenatos (40 µg de proteína) em 2 mL de meio de reação e foram interrompidas após 3 minutos.

As atividades enzimáticas da conversão de piruvato a lactato pela LDH foram  $0,97 \pm 0,12$  e  $1,87 \pm 0,39$  mM NADH  $\times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ , para homogenatos de cérebro e fígado,

respectivamente. O MMA inibiu significativamente a atividade desta enzima, de forma dose dependente, com  $IC_{50}$  de  $23,3 \pm 0,6$  mM e  $20,8 \pm 2,9$  mM para homogenatos de cérebro e fígado, respectivamente.

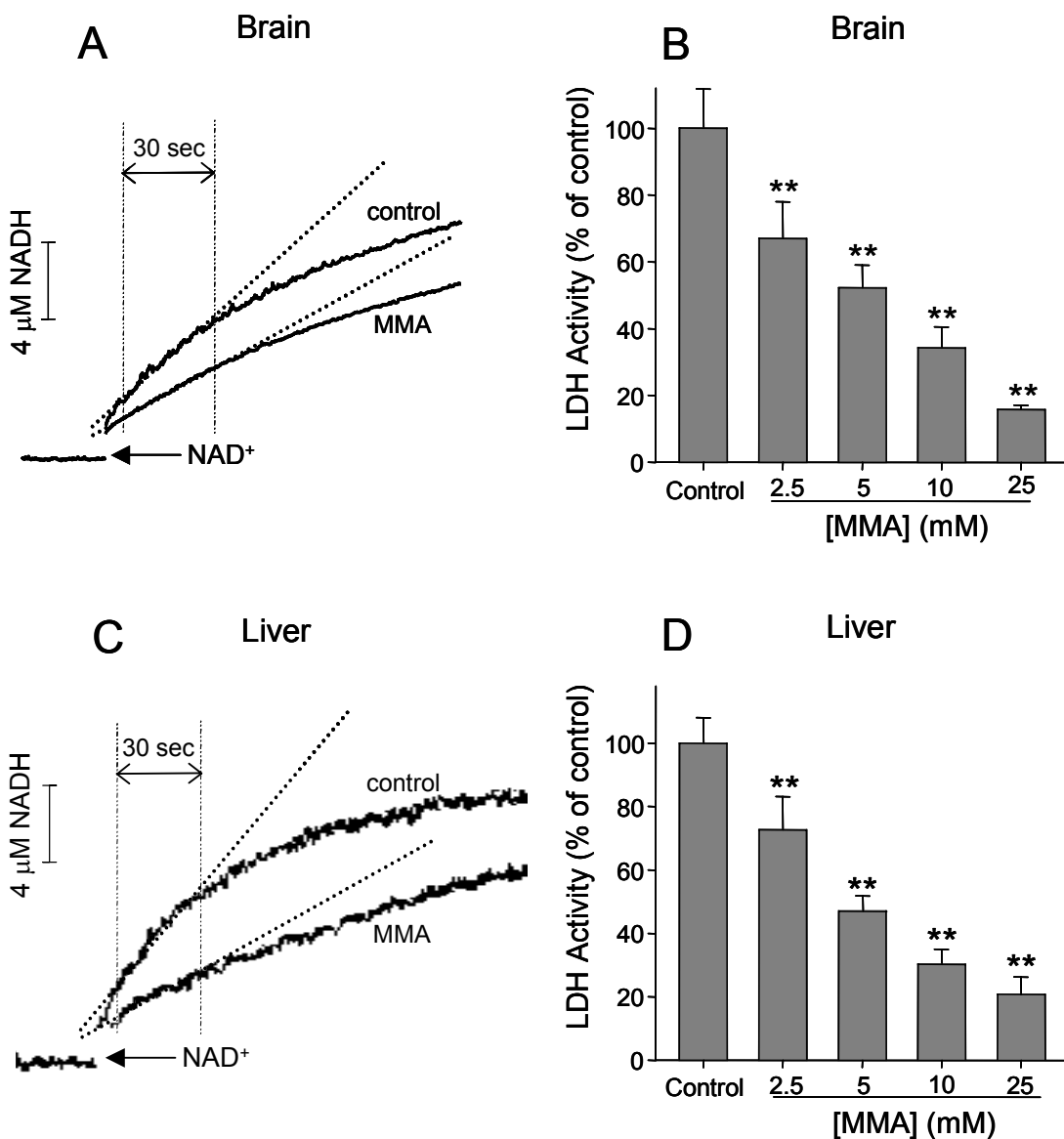




**Figura 7 – Efeito de metilmalonato (MMA) na conversão de piruvato a lactato catalisada pela lactato desidrogenase (LDH).** Homogenatos ( $20 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$ ) de cérebro (**Painéis A e B**) e fígado de rato (**Painéis C e D**) foram adicionados ao meio de reação a  $37^\circ\text{C}$  contendo Tris-HCl 50 mM pH 7,4, piruvato 0,1 mM e diferentes concentrações de MMA (5 - 50 mM). As reações foram iniciadas pela adição de NADH 0,1 mM. **Painéis A e C:** traçados representativos da conversão de piruvato a lactato medido pela oxidação de NADH em homogenatos na ausência (controle) e presença de 25 mM MMA. Valores são média  $\pm$  d.p. de 3-5 experimentos realizados em duplicata. \*\* $p < 0,01$ ; teste ANOVA comparado ao controle.

Para avaliar a reação de conversão de lactato a piruvato catalisada pela enzima LDH, os experimentos também foram conduzidos a 37°C sob agitação magnética constante, em meio de reação de Tris-HCl 50 mM pH 7,4, contendo lactato 2 mM, e diferentes concentrações de MMA (0 - 25 mM), como indicado nas figuras. As reações foram iniciadas pela adição de NAD<sup>+</sup> 0,8 mM após 30 segundos de pré-incubação do homogenato (40 µg de proteína) em 2 mL de meio de reação e paradas após 3 minutos (**Figura 8**). A concentração de lactato usada nestes experimentos foi semelhante à encontrada em condições fisiológicas (sangue venoso: 0,6 - 2,2 mmol × L<sup>-1</sup>, sangue arterial: 0,3 - 0,8 mmol × L<sup>-1</sup>) (Lehmann e Henry, 2001).

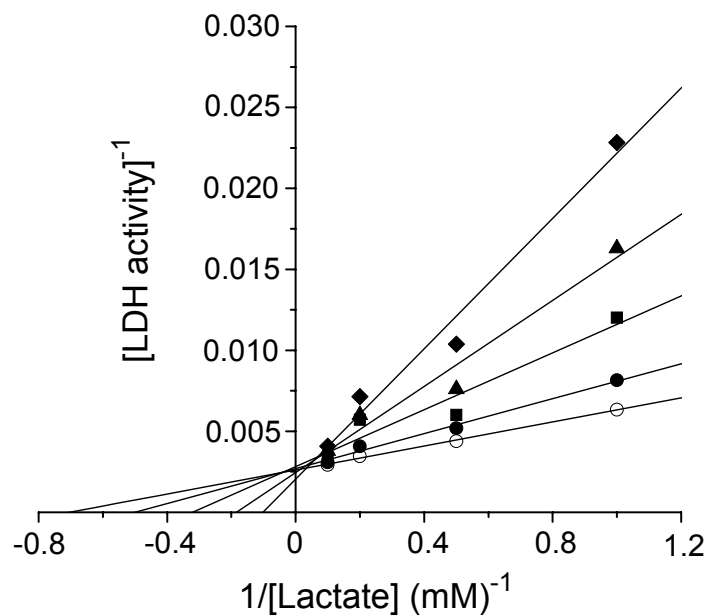
A atividade enzimática da lactato desidrogenase na conversão de lactato a piruvato em homogenatos de cérebro (**Painéis A e B**) e fígado (**Painéis C e D**) foi  $0,18 \pm 0,03$  e  $0,26 \pm 0,03$  mM NADH × min<sup>-1</sup> × mg<sup>-1</sup>, respectivamente. A reação de conversão de lactato a piruvato foi inibida na presença de concentrações mais baixas de MMA, com IC<sub>50</sub> de  $4,6 \pm 0,39$  mM e  $5,6 \pm 1,3$  mM em cérebro e fígado, respectivamente.



**Figura 8 – Efeito de MMA na conversão de lactato a piruvato catalisada pela LDH.** Homogenatos ( $20 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$ ) de cérebro (**Painéis A e B**) e fígado de rato (**Painéis C e D**) foram adicionados ao meio de reação a  $37^\circ\text{C}$  contendo Tris-HCl 50 mM pH 7,4, lactato 2 mM e diferentes concentrações de MMA (2,5 - 25 mM). As reações foram iniciadas pela adição de  $\text{NAD}^+$  0,8 mM ao meio de reação. **Painéis A e C:** traçados representativos da conversão de lactato a piruvato medida pela redução de  $\text{NAD}^+$  em homogenatos na ausência (controle) e presença de MMA 5 mM. Os valores representam a média  $\pm$  d.p. de 3-5 experimentos realizados em duplicata. \*\* $p < 0,01$ ; teste ANOVA comparado ao controle.

É interessante notar que o valor de  $IC_{50}$  de MMA para a reação de conversão de lactato a piruvato ( $4,6 \pm 0,39$  mM; **Figura 8B**) foi aproximadamente 5 vezes menor que a reação de conversão de piruvato a lactato ( $23,3 \pm 0,6$  mM; **Figura 7B**) catalisada por LDH em homogenato de cérebro. Desta forma, com a finalidade de caracterizar melhor o efeito inibitório do MMA na atividade da LDH *in vitro* na reação de conversão de lactato a piruvato em homogenato de cérebro, foram conduzidos experimentos de cinética enzimática (**Figura 9**).

O aumento da concentração de lactato reduz a inibição da LDH pelo MMA (**Figura 9**), provavelmente pela saturação do sítio de ligação do substrato na enzima, formando um gráfico de reciprocidade dupla, que indica que o MMA inibe a LDH competitivamente com o lactato. O valor de  $K_i$  encontrado ( $3,02 \pm 0,59$  mM) está dentro da mesma faixa de concentração plasmática de MMA observada em pacientes com acidemia metilmalônica durante as crises metabólicas (Fenton et al., 2001). O  $K_m$  para o substrato lactato nessas condições experimentais ( $1,79 \pm 0,32$  mM) também está na faixa de concentração de lactato observado em sangue venoso em condições fisiológicas. Esses resultados indicam que o MMA pode ser um relevante inibidor competitivo da conversão de lactato a piruvato em situações patológicas.



**Figura 9 – Caracterização do efeito inibitório *in vitro* do MMA na atividade da LDH de cérebro em converter lactato a piruvato.** Gráfico de reciprocidade dupla (*Lineweaver-Burk*). Competição entre lactato e MMA na atividade da LDH ( $\mu\text{M NAD}^+ \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ ) em homogenato de cérebro de rato ( $20 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$ ). Os valores representam a média  $\pm$  d.p. de 4-5 experimentos em duplicata. (○) controle (sem inibidor); (●) 1 mM; (■) 5 mM; (▲) 10 mM; (◆) 25 mM MMA.

#### 4.2. Parte B: Efeito de MMA na oxidação de substratos respiratórios por mitocôndrias isoladas.

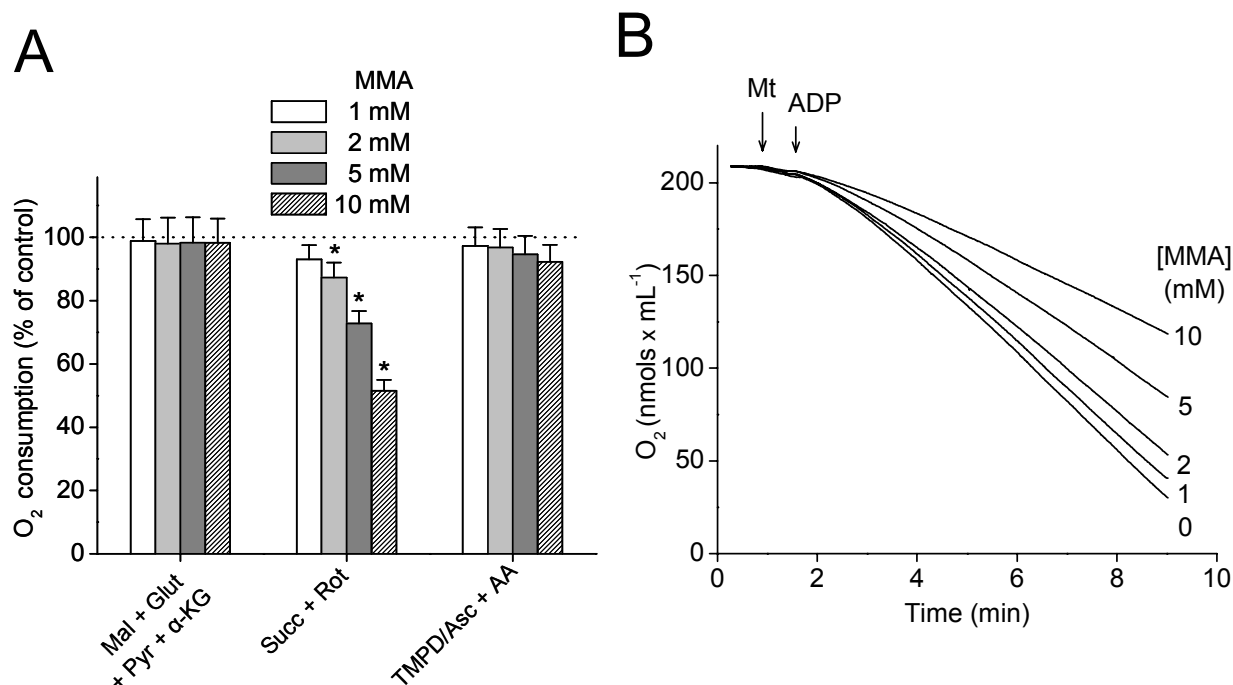
Na segunda parte dos resultados desta tese, caracterizou-se o efeito do MMA nos diferentes componentes da cadeia respiratória de mitocôndrias isoladas de cérebro. Dados da literatura indicam que na acidemia metilmalônica ocorre uma “isquemia metabólica”, com menor transporte de elétrons na cadeia respiratória e conseqüentemente inibição da respiração mitocondrial e da fosforilação oxidativa (McLaughlin et al., 1998; Toyoshima et al., 1995; Wajner et al., 1992).

Inicialmente foi monitorado o efeito de concentrações crescentes de MMA (1 - 10 mM) no consumo de oxigênio ( $O_2$ ) *in vitro* por mitocôndrias isoladas de cérebro de rato na presença de substratos para os complexos I, II e IV da cadeia respiratória (**Figura 10**). O consumo de oxigênio mitocondrial foi acompanhado no “estado respiratório 3” (Chance et al., 1955), isto é, durante a fosforilação de ADP, quando ocorre um estímulo da respiração mitocondrial.

Confirmando resultados prévios de nosso grupo (Maciel et al., 2004), a velocidade de consumo de oxigênio na presença de succinato como doador de elétrons para o complexo II apresentou inibição significativa por MMA de modo dose-dependente (**Figura 10, Painei A**). No entanto, o MMA não apresentou efeito inibitório na respiração quando utilizados substratos doadores de elétrons para complexo I (malato, glutamato, piruvato e  $\alpha$ -cetoglutarato) ou para o complexo IV (TMPD/ascorbato) (**Painei A**). Rotenona e antimicina A foram utilizados onde indicado para se obter inibição dos complexos respiratórios I e III, respectivamente. Os traçados representativos da respiração mostram que a inibição da respiração mitocondrial por MMA durante a oxidação do succinato é constante e dose dependente (**Painei B**).

As velocidades absolutas de consumo de  $O_2$  em mitocôndrias isoladas de cérebro na oxidação de substratos para complexo I, II e IV foram  $56,90 \pm 4,37$ ;  $70,38 \pm 4,05$  e  $25,68 \pm 2,82$  nmol  $O_2 \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$  proteína, respectivamente. Utilizando TMPD/ascorbato, verificou-se uma velocidade de respiração mitocondrial mais baixa que

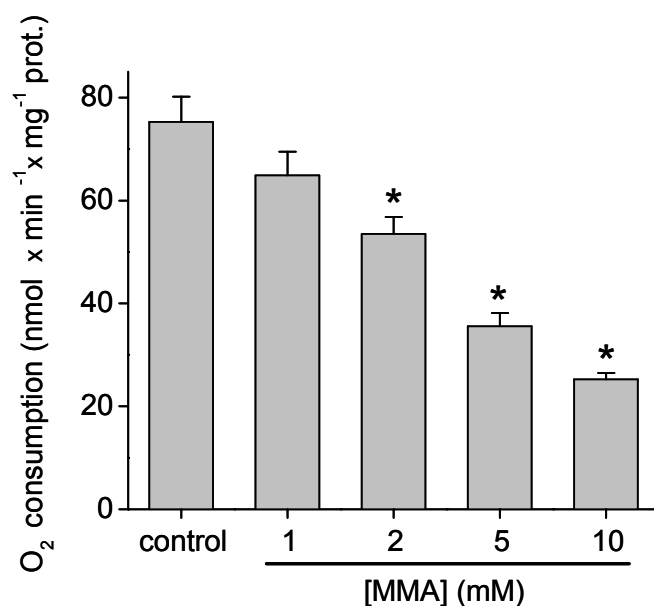
na presença de succinato. Isto provavelmente deve-se à acessibilidade limitada do citocromo *c* aos eletrões doados pelo TMPD nas preparações mitocondriais.



**Figura 10 – Efeito de MMA no consumo de oxigênio mitocondrial.** Mitocôndrias isoladas de cérebro de rato (Mt; 0,5 mg × mL<sup>-1</sup>) foram incubadas em meio de reação a 37°C (KCl 130 mM, HEPES-K<sup>+</sup> 10 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, EGTA 200 μM, ADP 800 μM, pH 7,2) contendo substratos para o complexo respiratório I [malato, glutamato, piruvato e α-cetoglutarato (Mal + Glut + Pyr + α-KG); 1,25 mM cada], succinato 5 mM + rotenona 2 μM (Succ + Rot) ou TMPD 200 μM/ascorbato 1 mM + antimicina A 1 μM (TMPD/Asc + AA) na presença de diferentes concentrações de MMA (0 - 10 mM). Rotenona e antimicina A foram usadas para inibição dos complexos I e III, respectivamente. **Painel A:** Valores de consumo de oxigênio mitocondrial em porcentagem do respectivo controle. **Painel B:** Figura representativa do efeito inibitório de MMA na respiração mantida por succinato. Os dados no Painel A representam a média ± e.p.m. de 5 experimentos independentes realizados em duplicata. \**p*<0,01; teste ANOVA comparado ao controle.

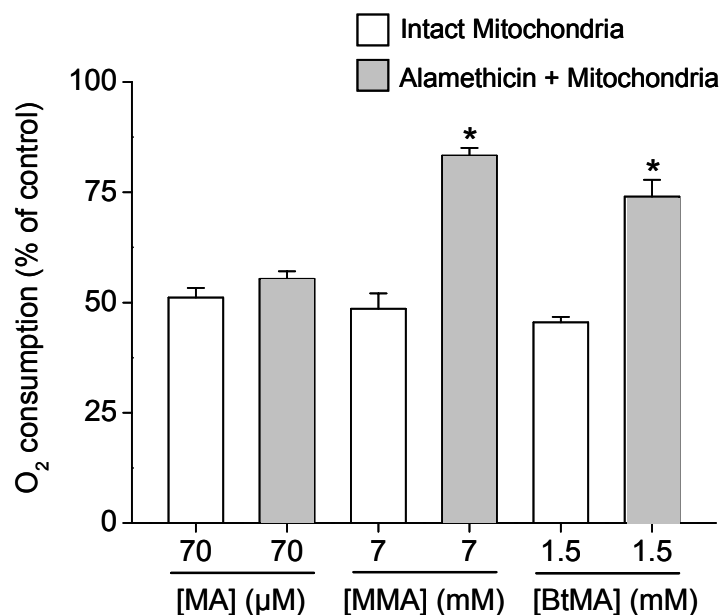
Kolker et al. (2003) não observaram efeito inibitório significativo de MMA (1 mM) na respiração por mitocôndrias de músculo esquelético de camundongo na presença de succinato. Para verificar se realmente o MMA não inibia a respiração mitocondrial mantida por succinato em tecido muscular, foram realizados experimentos com mitocôndrias isoladas de músculo esquelético de rato sob as mesmas condições experimentais aplicadas às mitocôndrias isoladas de cérebro. De fato, quando se testou 1 mM de MMA na respiração de mitocôndrias de músculo mantida por succinato, verificou-se apenas uma tendência à inibição da respiração (**Figura 11**). Entretanto, quando adicionamos MMA em concentrações mais altas (2 - 10 mM), uma inibição significativa e dose-dependente foi observada. Estes resultados indicam que o efeito inibitório do MMA na respiração mitocondrial mantida por succinato não é restrito ao cérebro (**Figura 10**; Maciel et al., 2004; Kowaltowski et al., 2006) e fígado (Toyoshima et al., 1995), ocorrendo também para o tecido muscular, porém dependente de concentrações superiores a 1 mM de MMA.





**Figura 11 – Efeito de MMA na respiração mantida por succinato em mitocôndrias isoladas de músculo.** Mitocôndrias isoladas de músculo esquelético de rato ( $0,5 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$ ) foram incubadas em meio de reação, conforme descrito na legenda da figura 10, na presença de succinato  $1 \text{ mM}$  e rotenona  $2 \text{ }\mu\text{M}$ . Medidas do consumo de oxigênio mitocondrial foram feitas em situação controle e na presença de diferentes concentrações de MMA ( $1 - 10 \text{ mM}$ ). Os valores representam a média  $\pm$  e.p.m. de 5 experimentos independentes realizados em duplicata.  $*p < 0,01$ ; teste ANOVA comparado ao controle.

Há controvérsias na literatura quanto ao efeito do MMA no metabolismo oxidativo mitocondrial. Alguns trabalhos indicaram que o MMA atua como inibidor competitivo da succinato desidrogenase (SDH) em homogenatos de cérebro e mitocôndrias isoladas de fígado de rato, provavelmente pela semelhança estrutural com o succinato (Dutra et al 1993; Toyoshima et al 1995) e malonato (MA), um inibidor clássico da SDH (Devlin, 2003). Entretanto, publicações recentes mostraram que MMA em concentrações milimolares não inibiu a atividade de SDH em partículas submitocondriais de coração bovino (Okun et al., 2002; Kolker et al., 2003). Por outro lado, o MA em concentrações micromolares, foi um inibidor potente desta enzima (Okun et al., 2002; Kolker et al., 2003). Estes dados da literatura, juntamente com os achados prévios do nosso laboratório (Maciel et al., 2004) e os presentes resultados, sugerem que o efeito inibitório de MMA na respiração mitocondrial poderia ser causado pela inibição no transporte mitocondrial de succinato através do carreador de dicarboxilatos. De fato, Halperin et al. (1971) descreveram que o MMA é um importante inibidor do transporte de malato por este transportador em mitocôndrias. Para testar tal hipótese, inicialmente foi monitorado o efeito de MMA no consumo de oxigênio mantido por succinato em situações em que não há o transporte desse substrato para a mitocôndria. Para isto, foram utilizados mitocôndrias de cérebros permeabilizadas não seletivamente por alameticina, um antibiótico que promove a formação de poros não seletivos na membrana mitocondrial interna (He et al., 1996). MA, MMA ou butilmalato (BtMA), um inibidor conhecido do carreador de dicarboxilatos (Robinson e Chappel, 1967), foram usados em concentrações necessárias para assegurar aproximadamente 50% de inibição da respiração mitocondrial das organelas intactas na presença de succinato 2 mM (**Figura 12, barras brancas**). Quando as mesmas concentrações de MA, MMA e BtMA foram usadas na presença de alameticina, a suspensão mitocondrial tratada com MA apresentou uma inibição similar do consumo de oxigênio apresentada por mitocôndrias intactas, entretanto o MMA e BtMA perderam a maior parte do efeito inibitório (**Figura 12, barras em cinza**). Este resultado sugere que o MMA inibe o transporte mitocondrial de succinato, resultando em inibição da respiração mantida por este substrato.



**Figura 12 – Efeito de MA, MMA e BtMA na respiração de mitocôndrias intactas ou permeabilizadas com alameticina.** Mitocôndrias isoladas de cérebro de rato ( $0,5 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$ ) foram incubadas em meio de reação conforme descrito na legenda da figura 10, na presença de succinato 2 mM, rotenona 2  $\mu\text{M}$ , citocromo *c* 5  $\mu\text{M}$  e ADP 800  $\mu\text{M}$ . O consumo de oxigênio mitocondrial foi medido na presença de MA 70  $\mu\text{M}$ , MMA 7 mM ou BtMA 1,5 mM. Onde indicado, alameticina ( $40 \mu\text{g} \times \text{mg proteína}^{-1}$ ) esteve presente. Os valores representam a média  $\pm$  e.p.m. de 5 experimentos independentes realizados em duplicata. \* $p < 0,01$ , teste ANOVA comparado ao controle.

Avaliou-se também a atividade enzimática da SDH para verificar a possibilidade do MMA inibir esta enzima. Foram utilizados mitocôndrias isoladas de cérebros permeabilizada com o detergente Triton X-100 1% sob condições experimentais semelhantes à da Figura 12. Observou-se que, enquanto MA inibiu aproximadamente 50% da atividade enzimática da SDH, MMA ou BtMA, em concentrações milimolares, não promoveram efeitos inibitórios significativos (**Tabela I**).

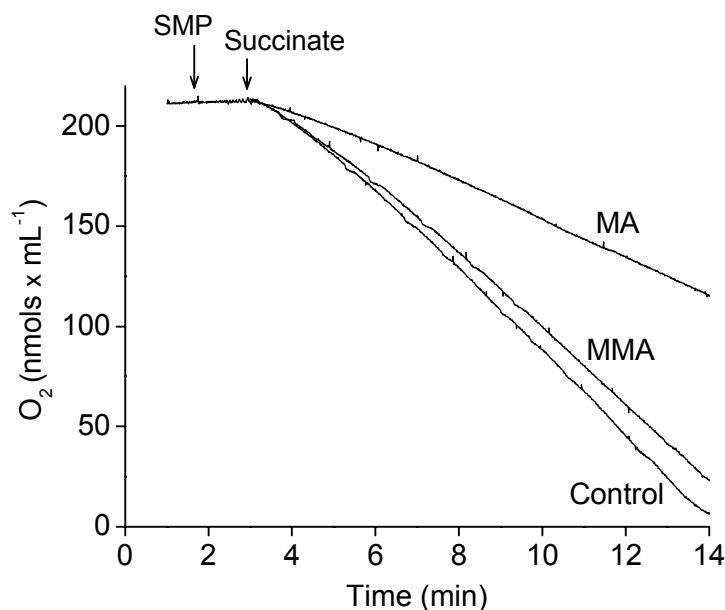
**Tabela I**

Efeito de malonato, metilmalonato e butilmalonato na atividade da succinato desidrogenase.

<b>Condições</b>	<b>Atividade SDH (% do controle)</b>
Malonato (MA)	53,1 ± 3,4 (*)
Metilmalonato (MMA)	94,5 ± 6,0
Butilmalonato (BtMA)	93,0 ± 6,8

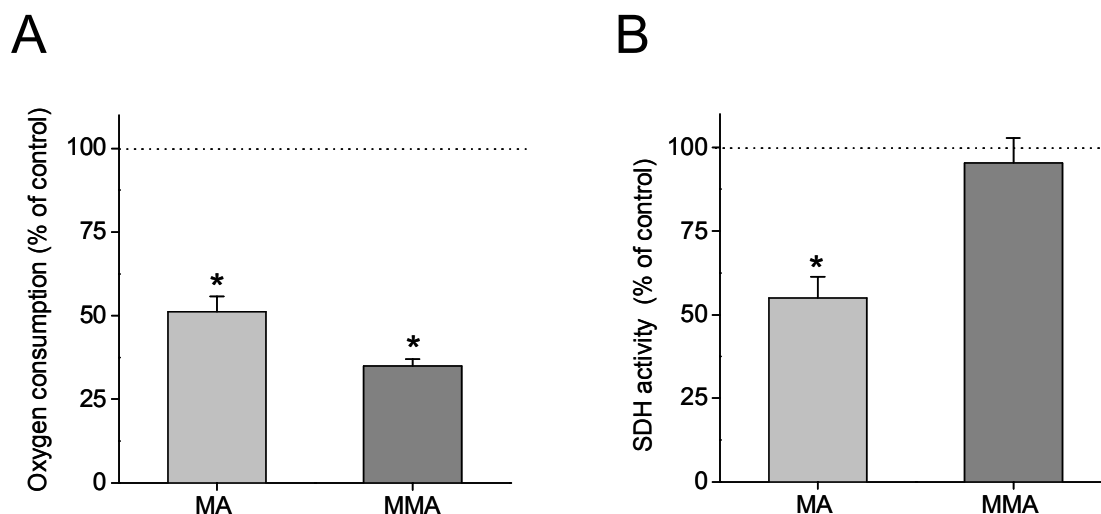
Atividade da SDH em mitocôndrias isoladas de cérebro foi determinada conforme descrito em Materiais e Métodos sob condições controle ou na presença de MA 70 µM, MMA 7 mM ou BtMA 1,5 mM. Sob condições controle, a atividade da SDH foi  $81,9 \pm 5,5$  nmol de DCPIP reduzido  $\times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$  de proteína. Os valores representam a média  $\pm$  e.p.m. de 4 experimentos independentes realizados em duplicata. \*Significativamente diferente do controle com  $p < 0,01$ .

O segundo protocolo experimental utilizado para se comprovar que o MMA não inibe a SDH, mas inibe a respiração mitocondrial por agir no transporte de succinato através da membrana mitocondrial, foi realizado com a utilização de uma suspensão rica em partículas submitocondriais invertidas. Esse experimento foi realizado sob as mesmas condições dos experimentos com mitocôndrias isoladas. Medimos o consumo de oxigênio por estas partículas na presença de MA 70  $\mu\text{M}$  ou MMA 7 mM (**Figura 13**). Apenas um pequeno efeito inibitório da respiração de partículas submitocondriais foi observado na presença de MMA em concentração milimolar, enquanto o MA, em concentração micromolar, resultou em inibição de aproximadamente 50% do consumo de oxigênio mantido por succinato.



**Figura 13 - Efeito de MA e MMA no consumo de oxigênio por partículas submitocondriais.** Partículas submitocondriais de fígado de rato (SMP; 0,1 mg  $\times$  mL<sup>-1</sup>) foram incubadas em meio de reação conforme descrito na legenda da figura 10, contendo succinato 1 mM, em condição controle ou na presença de MA 70  $\mu\text{M}$  ou MMA 7 mM. Figura representativa de 4 experimentos independentes feitos em duplicata.

Uma explicação para os resultados obtidos poderia ser que o MMA gerasse MA dentro da matriz mitocondrial, e que este MA produzido pudesse então inibir a SDH. Para verificar essa possibilidade, conduziu-se os experimentos mostrados na **Figura 14**. Nestes experimentos, utilizou-se mitocôndrias de fígado porque as medidas de atividade de SDH foram mais reprodutíveis do que quando realizadas com organelas de cérebro nestas mesmas condições (resultados não mostrados). Em mitocôndrias intactas de fígado, verificou-se que MA 70  $\mu\text{M}$  ou MMA 7 mM levaram a uma diminuição do consumo de oxigênio de aproximadamente 50% (**Painel A**). Amostras destas mitocôndrias intactas, após serem incubadas por 10 minutos na presença de MMA ou MA, foram coletadas e tratadas com o detergente Triton X-100, com a finalidade de permeabilizar a membrana mitocondrial e detectar o efeito na SDH de qualquer metabólito gerado a partir do MMA e acumulado na matriz. A atividade da SDH foi medida conforme descrito em Materiais e Métodos. Amostras pré-incubadas na presença de MA mostraram uma inibição da atividade de SDH, indicando que a inibição desta enzima induzida pelo MA poderia ser prontamente detectada sob estas condições após permeabilização das mitocôndrias (**Figura 14, Painel B**). A concentração mínima de MA presente durante o período de pré-incubação que resultou num efeito inibitório significativo da atividade da SDH foi 10  $\mu\text{M}$ , indicando que este ensaio é um método sensível para detectar a presença de MA na suspensão. Por outro lado, amostras pré-incubadas com MMA 7 mM não mostraram inibição da atividade de SDH após a suspensão mitocondrial ser permeabilizada com detergente. Este resultado indica claramente que nenhuma quantidade de MA ( $\geq 10 \mu\text{M}$ ) ou de outro metabólito de MMA funcionalmente significativo é acumulada na suspensão mitocondrial tratada com MMA.



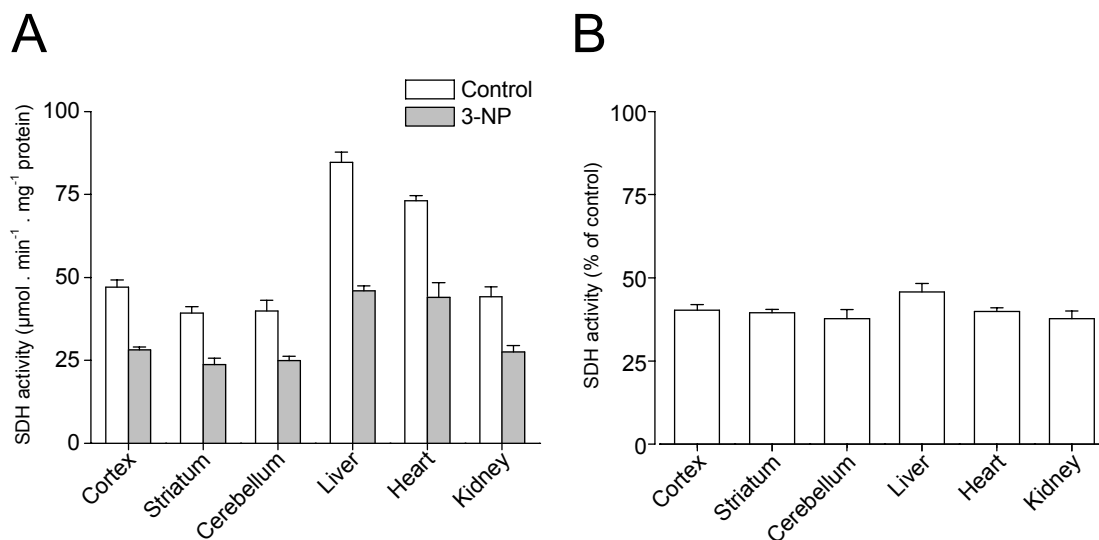
**Figura 14 – Efeito da pré-incubação com MA e MMA na atividade da SDH de mitocôndrias.** **Painel A:** Consumo de  $O_2$  por mitocôndrias isoladas de fígado de rato ( $0,4 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$ ) incubadas em meio de reação (KCl 130 mM, HEPES- $K^+$  10 mM,  $K_2HPO_4$  2 mM,  $MgCl_2$  1 mM, EGTA 200  $\mu\text{M}$ , ADP 800  $\mu\text{M}$ , pH 7,2) a  $37^\circ\text{C}$  na presença de succinato 1 mM, rotenona 2  $\mu\text{M}$ , MMA 7 mM ou MA 70  $\mu\text{M}$ . **Painel B:** Atividade da SDH (nmol de DCPIP reduzido  $\times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$  proteína), após 10 min de incubação nas condições citadas no Painel A. Após o período de pré-incubação, 1% Triton X-100 e os reagentes para a determinação da atividade da SDH (descrita em Materiais e Métodos) foram adicionados à suspensão mitocondrial em meio de reação contendo Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, a  $37^\circ\text{C}$ . A atividade da SDH nas condições controle foi  $90,6 \pm 5,9$  nmol de DCPIP reduzido  $\times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$  de proteína. Os valores representam a média  $\pm$  e.p.m. de 4 experimentos independentes em duplicatas. \* $p < 0.01$ , teste ANOVA comparado ao controle.

#### 4.3. Parte C: Caracterização da Transição de Permeabilidade Mitocondrial (MPT) induzida pelo inibidor da succinato desidrogenase 3-nitropropionato.

A administração sistêmica ou intracerebral de 3-nitropropionato (3-NP), um inibidor seletivo e irreversível do complexo II (succinato desidrogenase) da cadeia respiratória mitocondrial, resulta em lesão estriatal e morte neuronal em ratos similares às observadas na doença de Huntington (Beal et al., 1993; Brouillet et al., 1995; Lin e Beal, 2006). As lesões observadas estão associadas à inibição da fosforilação oxidativa e ocorrência de estresse oxidativo (Beal, 2005). Baseados nestas evidências, investigou-se o efeito do 3-NP na integridade da membrana mitocondrial interna, assim como o papel de íons  $\text{Ca}^{2+}$  neste processo.

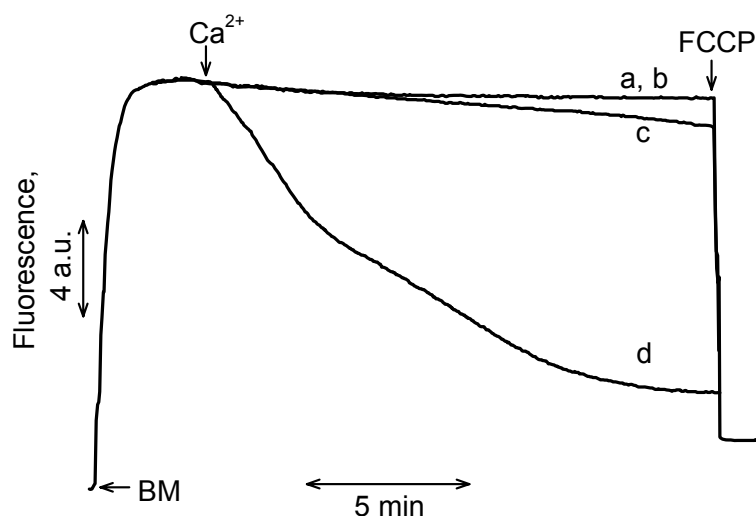
Para estudar o efeito sistêmico do 3-NP na atividade da SDH, utilizou-se homogenatos de diferentes tecidos de ratos após tratamento com 3-NP. Os animais receberam uma única dose intraperitoneal de salina ou 3-NP ( $30 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$  animal) e, após 24 h, estes foram sacrificados por deslocamento cervical. A atividade da enzima foi determinada em homogenatos de diferentes tecidos, na presença do detergente Triton X-100, como descrito em Materiais e Métodos. Na **figura 15 (Painel A)** observou-se que a atividade da SDH nos homogenatos de córtex, estriado, cerebelo, fígado, coração e rim dos animais tratados com 3-NP apresentaram inibição em torno de 50% da atividade em relação aos animais controles (tratados com salina). Apesar dos tecidos apresentarem diferentes atividades de SDH, observou-se que não há diferenças entre as inibições da enzima nos diferentes tecidos (**Painel B**).





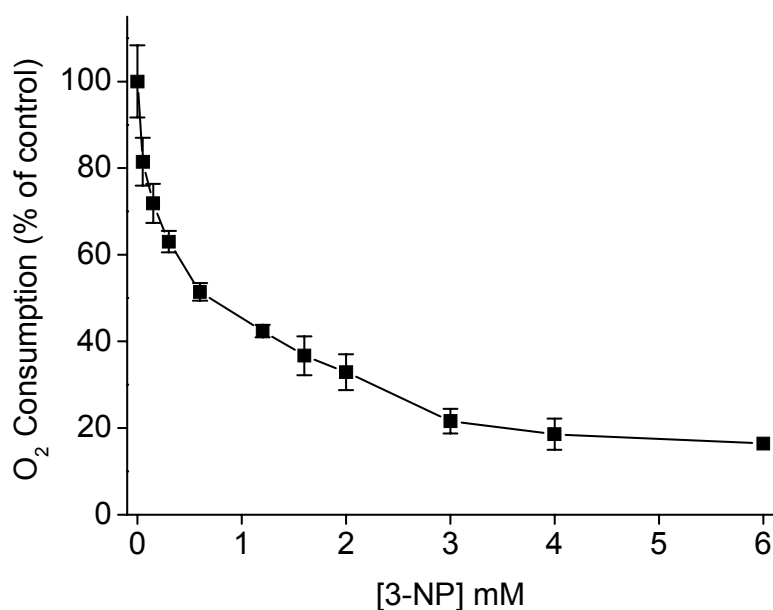
**Figura 15 - Inibição da atividade da SDH após tratamento *in vivo* com ácido 3-nitropropiónico (3-NP).** Homogenatos ( $200 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$ ) de córtex, estriado, cerebelo, fígado, coração e rim obtidos de ratos tratados com salina ou 3-NP ( $25 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$  animal, i.p.) foram adicionados ao meio de reação a  $37^\circ\text{C}$  contendo Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), Triton X-100 1% e os reagentes necessários para a dosagem da atividade da SDH, conforme descrito em Materiais e Métodos. **Painel A:** Inibição da atividade da SDH ( $\mu\text{mol DCPIP} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$  proteína). **Painel B:** Atividade relativa da enzima comparada ao controle. Os valores representam a média  $\pm$  e.p.m. de 4 experimentos independentes realizados em duplicata.

Uma vez que se observou que ocorre inibição da SHD pelo tratamento *in vivo* com 3-NP, avaliou-se a habilidade de mitocôndrias isoladas de cérebro de ratos tratados com 3-NP em acumular  $\text{Ca}^{2+}$  e reter o potencial elétrico transmembrânico ( $\Delta\psi$ ) comparadas aos animais controle. O efeito deste tratamento no  $\Delta\psi$  está representado na **Figura 16**. Foi utilizado o marcador lipofílico e catiônico safranina (5  $\mu\text{M}$ ) que entra nas mitocôndrias em resposta ao potencial elétrico formado (Åkerman e Wikström, 1976). Quando as mitocôndrias isoladas de cérebro de rato foram adicionadas ao meio de reação padrão a 37°C contendo succinato 5 mM e safranina, ocorreu uma rápida deflexão do traçado, compatível com a captação de safranina e formação do potencial de membrana. As mitocôndrias isoladas dos ratos controles (**linha a**) e tratados com 3-NP (**linha b**) foram capazes de manter o  $\Delta\psi$  por aproximadamente 20 minutos, mostrando que apenas a inibição parcial da SDH não foi capaz de resultar em queda do potencial transmembrânico mitocondrial. Por outro lado, a adição de  $\text{Ca}^{2+}$  25  $\mu\text{M}$  promoveu uma queda do  $\Delta\psi$  mais rápida nas mitocôndrias de animais tratados (**linha d**) do que em mitocôndrias de animais controles (**linha c**). A dissipação de  $\Delta\psi$  na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  é causada pela permeabilização da membrana mitocondrial interna (Kowaltowski et al., 2001). A adição de 1  $\mu\text{M}$  do desacoplador carbonil cianeto p-trifluorometoxifenil hidrazona (FCCP), conforme indicado na figura, despolarizou completamente a membrana mitocondrial.



**Figura 16 - Queda do potencial transmembrânico induzido pela adição de  $\text{Ca}^{2+}$  a mitocôndrias de cérebro de animais tratados com 3-NP.** Mitocôndrias isoladas de cérebro de rato (BM;  $0,4 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$ ) de animais tratados com 3-NP ( $25 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$  animal, i.p.) (*linha a*) ou controles (*linha b*) foram adicionadas ao meio de reação (KCl 130 mM, HEPES- $\text{K}^+$  10 mM,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM, EGTA 30  $\mu\text{M}$  e succinato 5 mM, pH 7,2), a  $37^\circ\text{C}$ , contendo safranina 5  $\mu\text{M}$ . Onde está indicado pela seta foi adicionado 25  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$  às mitocôndrias de animais controles (*linha c*) e de animais tratados (*linha d*). FCCP 1  $\mu\text{M}$  foi adicionado onde indicado. Figura representativa de 4 experimentos feitos em duplicata.

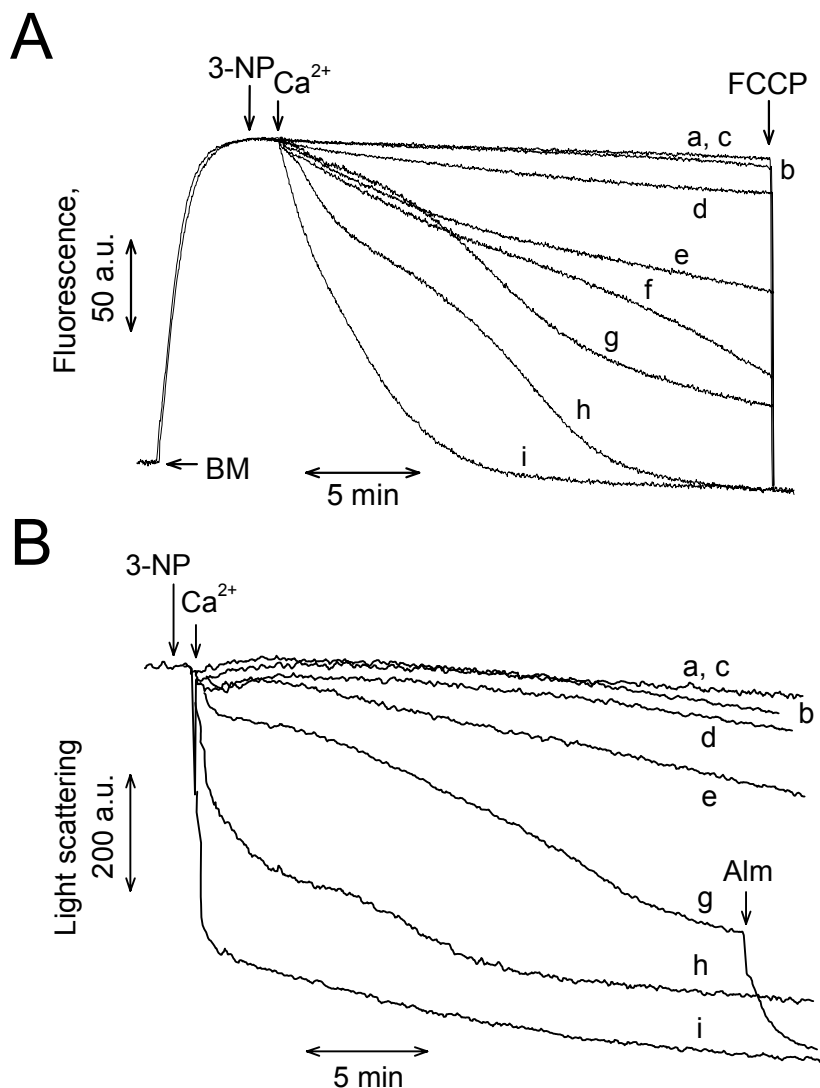
Com a finalidade de caracterizar nas mesmas condições experimentais a inibição do complexo II *in vitro* por 3-NP, determinou-se o efeito de diferentes concentrações deste inibidor na respiração de mitocôndrias isoladas de cérebro (**Figura 17**). Verificou-se que 50, 150, 300, 450, 600, 1200 e 1600  $\mu\text{M}$  de 3-NP inibiram em aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 70% a respiração mitocondrial no estado 3 (durante a fosforilação de ADP), situação em que a velocidade de respiração está próxima da máxima. Acima de 2 mM de 3-NP, observou-se uma inibição maior que 80% da respiração mitocondrial. O  $\text{IC}_{50}$  obtido para 3-NP foi de  $898 \pm 110 \mu\text{M}$ .



**Figura 17 – Inibição do complexo II da cadeia respiratória mitocondrial na presença de 3-NP.** Mitocôndrias isoladas de cérebro de rato ( $0,4 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$ ) foram adicionadas ao meio de reação a  $37^\circ\text{C}$  contendo KCl 130 mM, HEPES- $\text{K}^+$  10 mM, pH 7,2,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM, EGTA 200  $\mu\text{M}$ , succinato 5 mM e ADP 800  $\mu\text{M}$  na presença de diferentes concentrações de 3-NP (50, 150, 300, 450, 600, 1200, 1600, 2000, 3000, 4000 e 6000  $\mu\text{M}$ ). Após a adição da mitocôndria, o tempo considerado para estimar a inibição do consumo de  $\text{O}_2$  foi entre 2-5 min.

Com o intuito de testar o efeito da inibição *in vitro* do complexo II na suscetibilidade à transição de permeabilidade mitocondrial, monitorou-se a queda do  $\Delta\psi$  e o inchamento mitocondrial induzidos por  $\text{Ca}^{2+}$  na presença de diferentes concentrações de 3-NP. Os resultados da **Figura 18** mostram que a ausência (*linha a*) ou adição de  $\text{Ca}^{2+}$  40  $\mu\text{M}$  (*linha b*) não alteraram significativamente o  $\Delta\psi$ . O mesmo foi observado na presença apenas de 3-NP 1200  $\mu\text{M}$  (*linha c*), concentração que inibe aproximadamente 70% da respiração mitocondrial. Por outro lado, verificou-se queda do  $\Delta\psi$  mitocondrial induzida pela adição de  $\text{Ca}^{2+}$  na presença de concentrações crescentes de 3-NP de forma dose-dependente (**Painel A, linhas e - i**). Constatou-se que 10% de inibição da velocidade máxima de respiração por 3-NP (50  $\mu\text{M}$ ), já resultou em maior sensibilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$  (40  $\mu\text{M}$ ) à perda do potencial (*linha e*). Notadamente, a acentuada queda do  $\Delta\psi$ , provocada por 3-NP 1200  $\mu\text{M}$  e  $\text{Ca}^{2+}$  40  $\mu\text{M}$ , foi prevenida pela presença concomitante de CsA, ATP e oligomicina (*linha d*), potentes inibidores da transição de permeabilidade mitocondrial (MPT) em cérebro (Connern e Halestrap, 1994; Leventhal et al., 2000; Maciel et al., 2003). Isso indica que essa queda do  $\Delta\psi$  não foi provocada somente pela inibição da respiração. Esses resultados sugerem que o 3-NP é um potencializador da MPT induzida por  $\text{Ca}^{2+}$ , num mecanismo associado à inibição da SDH.

Uma característica das mitocôndrias que sofrem MPT é a formação de poros não seletivos na membrana mitocondrial interna. Estes poros são permeáveis a cátions e ânions de até 1,4 kDa (Zoratti e Szabo, 1995), o que resulta em inchamento mitocondrial. Este inchamento pode ser monitorado pela diminuição do espalhamento de luz pela suspensão mitocondrial no comprimento de onda 540 nm. Desta forma, para confirmar que a queda do  $\Delta\psi$  estava relacionada à permeabilização da membrana interna devido à MPT, determinou-se o inchamento mitocondrial (**Painel B**). Como verificado nas medidas de potencial de membrana, na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  (*linha a*) ou na presença isolada de  $\text{Ca}^{2+}$  40  $\mu\text{M}$  (*linha b*) ou 3-NP 1200  $\mu\text{M}$  (*linha c*), não houve mudanças significativas no espalhamento de luz. Entretanto, quando  $\text{Ca}^{2+}$  (40  $\mu\text{M}$ ) foi adicionado na presença de concentrações crescentes de 3-NP, observou-se uma progressiva diminuição no espalhamento de luz, indicando inchamento mitocondrial (*linhas e - i*). Alameticina, que forma poros não seletivos na membrana interna (He et al., 1996), foi adicionada no final dos experimentos para resultar em inchamento máximo possível.



**Figura 18 – Transição de permeabilidade mitocondrial (MPT) induzida por  $\text{Ca}^{2+}$  e 3-NP em mitocôndrias isoladas de cérebro de rato (BM).** Mitocôndrias foram adicionadas ao meio de reação descrito na legenda da figura 16. **Painel A: Medida do potencial transmembrânico.** Ao meio de reação foi adicionado safranina  $5 \mu\text{M}$ . Onde indicado foram adicionados BM ( $0,4 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$ ), 3-NP,  $\text{Ca}^{2+}$  e FCCP  $1 \mu\text{M}$ . **Painel B: Medida do inchamento mitocondrial.** Foram adicionados ao meio de reação, BM ( $0,4 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$ ), 3-NP,  $\text{Ca}^{2+}$  e alameticina (Alm;  $40 \mu\text{g} \times \text{mg}^{-1}$  proteína). As *linhas b* representam experimentos onde somente  $\text{Ca}^{2+}$   $40 \mu\text{M}$  foi adicionado. As *linhas c* representam experimentos onde somente 3-NP  $900 \mu\text{M}$  foi adicionado, na presença de EGTA  $200 \mu\text{M}$ . 3-NP foi adicionado onde indicado:  $50 \mu\text{M}$  (*linhas e*),  $150 \mu\text{M}$  (*linhas f*),  $300 \mu\text{M}$  (*linhas g*),  $600 \mu\text{M}$  (*linhas h*),  $1200 \mu\text{M}$  (*linhas i e d*),  $\text{Ca}^{2+}$   $40 \mu\text{M}$  foi adicionado onde indicado (*linhas b, d – i*). A *linha d* representa o experimento *i* na presença de CsA  $1 \mu\text{M}$ , ATP  $200 \mu\text{M}$  e oligomicina  $1 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$ .

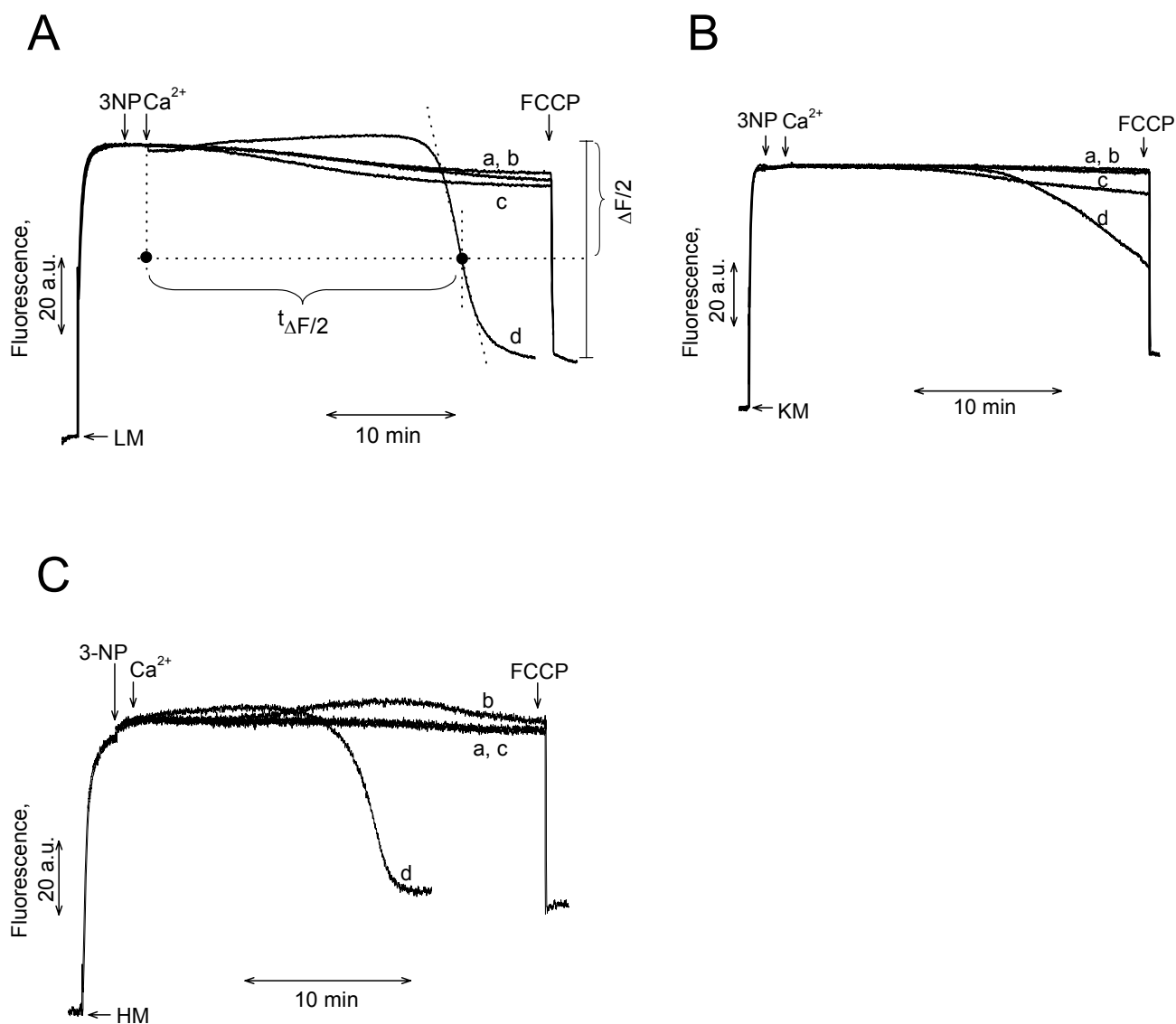
Desde os primeiros estudos sobre MPT realizados por Hunter e Haworth (1979), ficou constatado que a ausência de fatores endógenos, como os nucleotídeos de adenina e  $Mg^{2+}$ , favoreciam a ocorrência deste fenômeno. Enquanto o  $Mg^{2+}$  compete com o  $Ca^{2+}$  pelos sítios de ligação na membrana mitocondrial (Kolwadowski et al., 1998), ADP e ATP inibem a MPT por se ligarem ao translocador de nucleotídeos de adenina (Castilho et al., 1996; Halestrap et al., 1997; Kristian et al., 2002). Com a finalidade de investigar se o fenômeno MPT, induzido por 3-NP e  $Ca^{2+}$ , também ocorreria na presença de inibidores fisiológicos, conduziu-se os experimentos da **Figura 19** na presença de  $Mg^{2+}$  4 mM, ATP 2 mM e oligomicina  $1 \mu g \times mL^{-1}$  (**linha a**). Sob estas condições, analisou-se o efeito da adição do íon  $Ca^{2+}$  na presença ou ausência 3-NP. As mitocôndrias isoladas de cérebro de rato foram capazes de acumular e reter  $Ca^{2+}$  180  $\mu M$  até o momento da adição do protonóforo FCCP (**linha c**). A adição apenas de 3-NP 600  $\mu M$  também não alterou o potencial de membrana mitocondrial (**linha b**). Entretanto, a presença concomitante de 3-NP e  $Ca^{2+}$  resultou numa queda gradativa do potencial de membrana (**linha e**), que foi prevenida pela presença de CsA. Conclui-se que uma inibição parcial da succinato desidrogenase torna as mitocôndrias mais susceptíveis à MPT induzida por  $Ca^{2+}$ , mesmo na presença de inibidores fisiológicos da MPT.





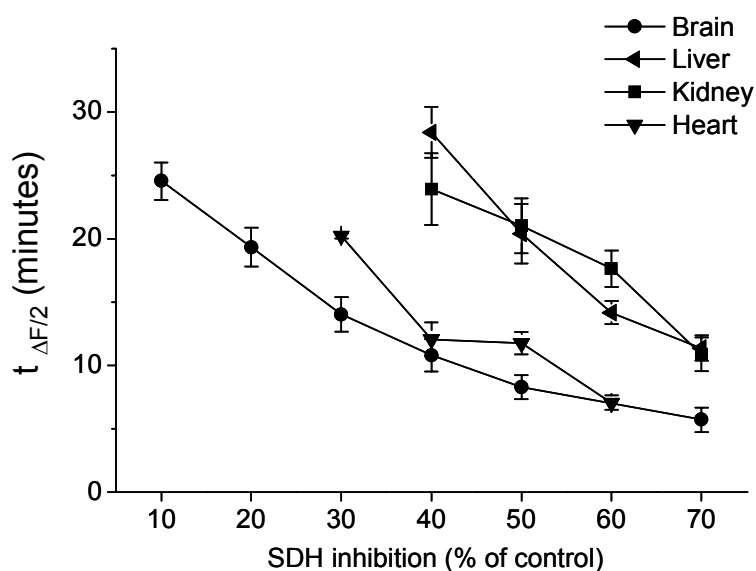
Após a determinação da sensibilidade à MPT em mitocôndrias isoladas de cérebro em relação ao  $\text{Ca}^{2+}$  e 3-NP, comparou-se tais resultados com mitocôndrias isoladas de fígado, rim e coração de rato para verificar se este fenômeno seria específico para cérebro. Inicialmente, incubou-se mitocôndrias de fígado, rim e coração de rato em meio de reação padrão (conforme descrito na legenda da Figura 17) e determinou-se as porcentagens de inibição da respiração mitocondrial mantida por succinato 5 mM na presença de diferentes concentrações 3-NP (resultados não mostrados). Os  $\text{IC}_{50}$  encontrados para 3-NP foram: fígado:  $1.842 \pm 183 \mu\text{M}$ ; rim:  $2.496 \pm 279 \mu\text{M}$  e coração:  $1.021 \pm 193 \mu\text{M}$ . Em concentrações de 3-NP próximos a estes valores de  $\text{IC}_{50}$ , testou-se o seu possível efeito sinérgico com  $\text{Ca}^{2+}$  em induzir MPT em organelas isoladas de fígado, rim e coração (**Figura 20, Painéis A, B e C**, respectivamente).

As adições apenas de  $\text{Ca}^{2+}$  (**linhas a**) ou 3-NP (**linhas c**) isoladamente, não interferiram no potencial de membrana mitocondrial, enquanto uma queda do potencial de membrana foi verificada na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  e 3-NP (**linhas d**), num processo sensível a inibidores da MPT (**linhas b**).



**Figura 20 - Transição de permeabilidade mitocondrial (MPT) induzida por  $\text{Ca}^{2+}$  e 3-NP em mitocôndrias isoladas de diferentes tecidos.** Mitocôndrias isoladas de fígado (LM;  $0,5 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$ ; **Painel A**), rim (KM;  $0,5 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$ ; **Painel B**) e coração de rato (HM;  $0,25 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$ ; **Painel C**) foram adicionadas ao meio de reação a  $37^\circ\text{C}$  descrito na legenda da figura 16 contendo safranina  $5 \mu\text{M}$ . Onde está indicado pelas setas, foram adicionados mitocôndrias, 3-NP  $2 \text{ mM}$  (**Painéis A e B**) e  $1,2 \text{ mM}$  (**Painel C**) (*linhas b - d*),  $\text{Ca}^{2+}$  para obter concentrações livres de  $22$  a  $30 \mu\text{M}$  (*linhas a, b, d*) e FCCP  $1 \mu\text{M}$ . As *linhas b* representam experimentos na presença de 3-NP,  $\text{Ca}^{2+}$  e CsA  $1 \mu\text{M}$ , ATP  $200 \mu\text{M}$  e oligomicina  $1 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$ .

Com a finalidade de se comparar a sensibilidade das mitocôndrias destes tecidos a MPT induzida por 3-NP e  $\text{Ca}^{2+}$  mediu-se o tempo necessário para que as mitocôndrias isoladas a partir de diferentes tecidos perdessem metade da intensidade de fluorescência relativa ao potencial de membrana após as adições de 3-NP e  $\text{Ca}^{2+}$ . Observou-se que as mitocôndrias de fígado e rim foram mais resistentes à queda do potencial devido a MPT quando comparadas às mitocôndrias de coração (**Figura 21**).



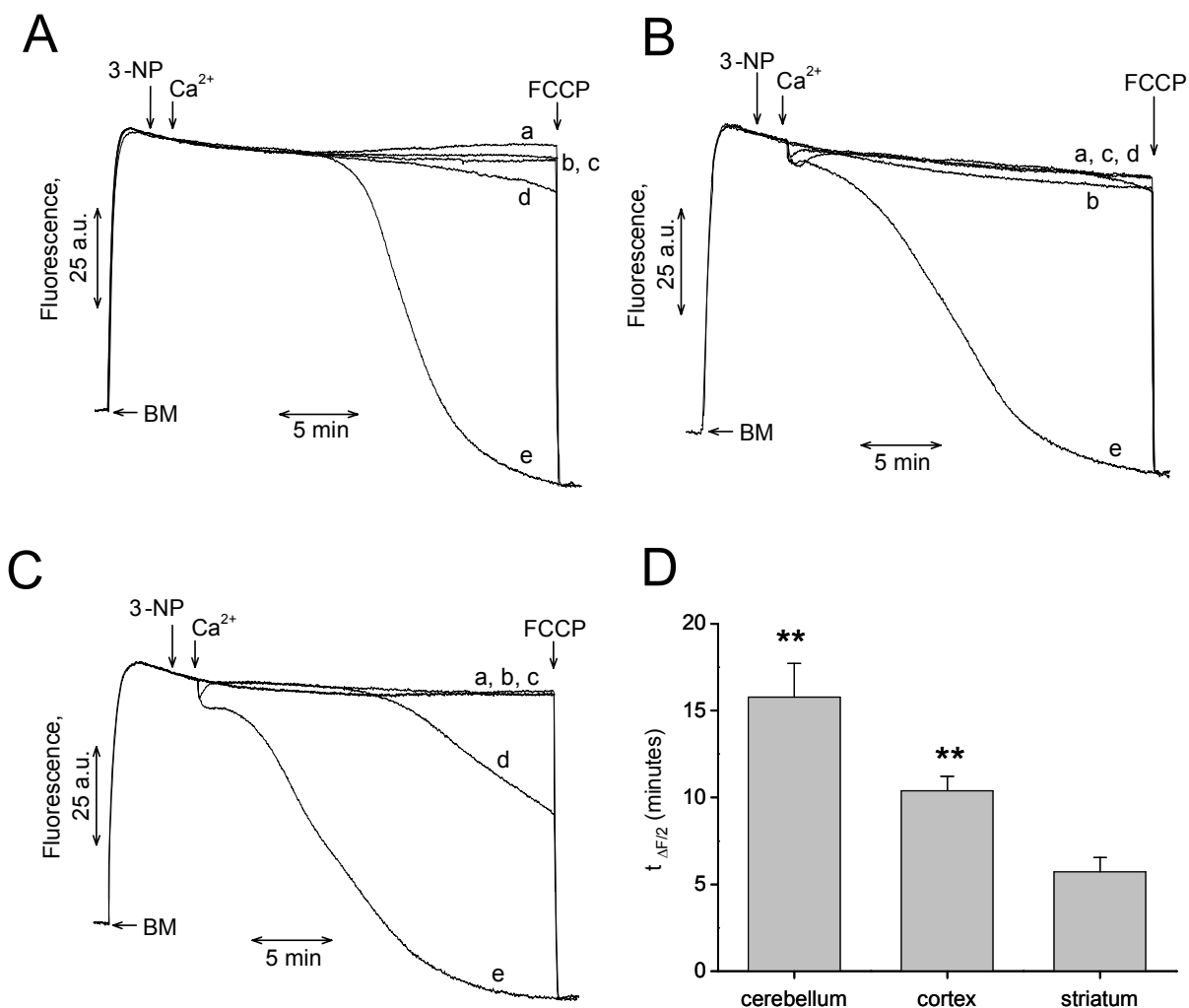
**Figura 21 – Mitocôndrias de cérebro e coração são mais sensíveis à perda da metade do potencial transmembrânico na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  e 3-NP quando comparadas às mitocôndrias de fígado e rim.** Comparação do tempo necessário para que as mitocôndrias dos diferentes tecidos perdessem metade de intensidade de fluorescência relativa ao potencial transmembrânico na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  para obter concentrações livres de 22 a 30  $\mu\text{M}$  e de diferentes concentrações de 3-NP para se obter diferentes porcentagens de inibição da SDH (10 - 70 %). Os valores representam a média  $\pm$  e.p.m. de 5 experimentos independentes realizados em duplicata.

Ao se utilizar a concentração de 3-NP que inibiu 50% da respiração, pôde-se constatar que os tempos necessários para que as mitocôndrias de fígado e rim perdessem metade do  $\Delta\psi$  total foram  $20,4 \pm 2,3$  e  $21,0 \pm 2,1$  minutos, respectivamente. No entanto, as mitocôndrias de cérebro e coração tiveram esse processo desencadeado na metade desse tempo ( $8,2 \pm 0,9$  e  $11,7 \pm 0,8$  minutos, respectivamente).

A seguir, mitocôndrias isoladas de diferentes regiões cerebrais foram comparadas quanto à sensibilidade à MPT induzida por 3-NP e  $\text{Ca}^{2+}$ . Mitocôndrias isoladas de cerebelo, córtex e estriado de rato foram incubadas em meio de reação padrão (conforme descrito na legenda da Figura 17) e foram determinadas as porcentagens de inibições da respiração mitocondrial mantida por succinato 5 mM e ADP 800  $\mu\text{M}$  na presença de diferentes concentrações 3-NP (resultados não mostrados).

Foram determinados os  $\text{IC}_{50}$  para 3-NP nas três preparações mitocondriais: cerebelo:  $1.165 \pm 86 \mu\text{M}$ ; córtex:  $1.178 \pm 52 \mu\text{M}$  e estriado:  $1.015 \pm 20 \mu\text{M}$ . Nessas concentrações de 3-NP, testou-se o efeito sinérgico deste inibidor da SDH e  $\text{Ca}^{2+}$  em induzir MPT (**Figura 22, Painéis A, B e C**). Adições apenas de  $\text{Ca}^{2+}$  (*linhas b*) ou de 3-NP (*linhas c*) não alteraram o potencial de membrana mitocondrial. Entretanto, ao se adicionar  $\text{Ca}^{2+}$  e 3-NP 900  $\mu\text{M}$ , o potencial foi totalmente dissipado (*linhas e*). Esta queda do  $\Delta\psi$  foi prevenida pela presença concomitante de CsA 1  $\mu\text{M}$ , ATP 200  $\mu\text{M}$  e oligomicina 1  $\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$  (*linhas d*).

Observou-se que as mitocôndrias estriatais são mais susceptíveis à indução da MPT quando comparados às mitocôndrias de córtex e estriado (**Painel D**). Enquanto as mitocôndrias de cerebelo e córtex precisaram de  $15,7 \pm 1,9$  e  $10,3 \pm 0,8$  minutos, respectivamente, para perderem metade da fluorescência relativa ao  $\Delta\psi$  após a adição de  $\text{Ca}^{2+}$ , as mitocôndrias de estriado apresentaram queda do potencial de membrana em apenas  $5,7 \pm 0,8$  minutos.



**Figura 22 – Transição de permeabilidade mitocondrial (MPT) induzida por  $\text{Ca}^{2+}$  e 3-NP em mitocôndrias isoladas de diferentes tecidos cerebrais.** Mitocôndrias isoladas (BM; 0,4 mg  $\times$  mL $^{-1}$ ) de cerebelo (**Painel A**), córtex (**Painel B**) e estriado (**Painel C**) foram adicionadas ao meio de reação a 37°C conforme descrito na legenda da figura 10 contendo safranina 5  $\mu$ M. Onde indicado foram adicionados BM, 3-NP 900  $\mu$ M (*linhas c - e*),  $\text{Ca}^{2+}$  para obter concentrações livres de 22 a 28  $\mu$ M (*linhas b, d, e*) e FCCCP 1  $\mu$ M. As *linhas d* representam experimentos na presença de 3-NP,  $\text{Ca}^{2+}$  e CsA 1  $\mu$ M, ATP 200  $\mu$ M e oligomicina 1  $\mu$ g  $\times$  mL $^{-1}$ . As *linhas a* representam experimentos controle sem adição de 3-NP e  $\text{Ca}^{2+}$ . **Painel D:** comparação entre o tempo (minutos) necessário para que as diferentes mitocôndrias perdessem metade da intensidade de fluorescência relativa ao potencial transmembrânico na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  e 3-NP. Os valores representam a média  $\pm$  e.p.m. de 4 experimentos independentes em duplicata. \*\* $p < 0,01$ ; teste ANOVA comparado com a mitocôndria de estriado.

## *5. Discussão*

Na *primeira parte* deste trabalho, estudou-se o efeito inibitório do MMA na atividade da LDH em homogenatos obtidos a partir de cérebro e fígado de ratos adultos. Foram avaliadas as conversões de lactato a piruvato e de piruvato a lactato. Notadamente, níveis de MMA, observados durante as crises de descompensação metabólica em pacientes com MMAemia, isto é, até 3 mM (Hoffmann et al., 1993; Hoffmann et al., 1994; Fenton et al., 2001), inibiram significativamente a conversão de lactato para piruvato catalisada pela LDH (**Figura 8**) e resultaram num menor efeito inibitório sobre a conversão de piruvato a lactato (**Figura 7**). Estes experimentos foram realizados na presença de concentrações fisiológicas de lactato ou piruvato.

Em células de mamíferos, as isoenzimas da LDH são compostas por quatro cadeias polipeptídicas, contendo proporções diferentes de dois subtipos de polipeptídeos: a cadeia **A** (também designada M, de músculo em inglês) e a cadeia **B** (também designado por H, de coração) (Kaplan e Everse, 1972). Os polipeptídeos formados pela cadeia **A** predominam em tecidos sujeitos a condições anaeróbicas, como no músculo esquelético (isoenzima **A<sub>4</sub>**). A cadeia **B** é predominante em tecidos aeróbios, como no coração (isoenzima **B<sub>4</sub>**). A cadeia **A** parece funcionar principalmente na redução de piruvato por NADH a lactato, enquanto a cadeia **B** é mais adaptada para catalisar a reação reversa. No cérebro, observa-se a predominância da isoenzima **B<sub>4</sub>** em neurônios, enquanto os astrócitos possuem tanto as isoenzimas **A<sub>4</sub>** como **B<sub>4</sub>** (Bittar et al., 1996). Dessa forma, os experimentos feitos com homogenato de cérebro apresentam uma mistura das isoenzimas. O fígado apresenta predominantemente a isoenzima **A<sub>4</sub>** (Brooks et al., 1999). Esses resultados mostraram que homogenatos de fígado (**A<sub>4</sub>**) (**Figura 8**) e de coração (**B<sub>4</sub>**) (Saad et al., 2006), mas não de músculo (**A<sub>4</sub>**) (Saad et al., 2006), apresentam sensibilidade similar ao efeito inibitório de MMA na conversão de piruvato a lactato catalisada LDH. Assim, conclui-se que não há indicação que as diferentes isoenzimas de LDH apresentam diferentes suscetibilidades ao efeito inibitório de MMA.

Estudos de cinética enzimática, em homogenato de cérebro, indicaram que o MMA inibe competitivamente a LDH de cérebro, ao competir pelo sítio catalítico da enzima com o substrato lactato (**Figura 9**). É interessante notar que o valor encontrado de  $K_i$  ( $3,02 \pm 0,59$  mM) foi similar à concentração máxima de MMA já observada em

pacientes durante as crises metabólicas (Hoffmann et al., 1993; Hoffmann et al., 1994; Fenton et al., 2001). O  $K_m$  encontrado para o lactato sob as nossas condições experimentais ( $1,79 \pm 0,32$  mM) está na mesma faixa da concentração fisiológica de lactato (sangue venoso: 0,6 - 2,2 mmol/L, arterial: 0,3 - 0,8 mmol/L) (Lehmann e Henry, 2001), indicando que a enzima LDH não está saturada em relação ao lactato.

Esses resultados indicam que o MMA é um importante inibidor da conversão de lactato a piruvato catalisada pela LDH em situações patológicas. Esta inibição pode contribuir para o acúmulo de lactato e inibição da gliconeogênese observada nos pacientes com MMAemia (Oberholzer et al., 1967; Worthen et al., 1994; Wajner e Coelho, 1997; Fenton et al., 2001), uma vez que o lactato é uma importante fonte de átomos de carbono para a síntese da glicose na gliconeogênese. A disfunção mitocondrial devido à MPT promovida pelo MMA e  $\text{Ca}^{2+}$  (Maciel et al., 2004) pode aumentar o metabolismo glicolítico e contribuir para o acúmulo de lactato na MMAemia. Além disso, quando o MMA atinge concentrações elevadas no SNC, a inibição da LDH pode prejudicar o uso de lactato por neurônios (Gladden, 2004; Pellerin e Magistretti, 1994), comprometendo o metabolismo energético neuronal e a transmissão glutamatérgica. Isto poderia ocorrer, pois o metabolismo de astrócitos é predominantemente glicolítico, enquanto o de neurônios é predominantemente oxidativo. Assim nos astrócitos ocorre produção de lactato, que é transportado aos neurônios, onde será um dos principais substratos energéticos (Pellerin e Magistretti, 1994; Gladden, 2004).

Além da inibição da LDH, outras enzimas relacionadas com o metabolismo energético também podem ser inibidas por MMA, como a piruvato carboxilase (Oberholzer et al., 1967),  $\beta$ -hidroxibutirato desidrogenase (Dutra et al., 1993) e a creatina quinase mitocondrial (Schuck et al., 2004).

Na *segunda parte* do presente trabalho, investigou-se o efeito inibitório do MMA na oxidação mitocondrial de succinato. Em mitocôndrias isoladas intactas de cérebro e músculo, concentrações milimolares de MMA inibiram o consumo de  $\text{O}_2$  mantido por succinato (**Figuras 10 e 11**). Nessas condições experimentais, pudemos verificar que as inibições obtidas são imediatas e constantes (**Figura 10B**), sugerindo um efeito direto do



MMA na respiração mitocondrial mantida por succinato e não uma interação progressiva deste composto com os componentes mitocondriais ou formação de produtos reativos. Estes resultados estão de acordo com estudos prévios da literatura, que mostram um efeito inibitório de MMA no consumo de O<sub>2</sub> mantido por succinato em mitocôndrias isoladas de fígado (Toyoshima et al., 1995) e cérebro (Maciel et al., 2004; Kowaltowski et al., 2006). Adicionalmente, mostrou-se que não houve inibição da respiração mitocondrial por MMA quando utilizou-se substratos para os complexos I ou IV da cadeia respiratória.

Outra hipótese para explicar o efeito inibitório do MMA sobre a cadeia respiratória mitocondrial sugere uma produção intramitochondrial de metabólitos como malonato e 2-metilcitrato. Okun et al. (2002) relataram a formação de MA em cultura de neurônios estriatais tratados com MMA (10 mmol/L), mas o MA foi detectado apenas em concentrações nanomolares e após 2 h de incubação. No entanto, nessas condições experimentais, não se observou produção significativa de MA em mitocôndrias isoladas de fígado (sensibilidade da análise: ~ 25 nmol/mg proteína), incubadas por 10 min na presença de MMA (17,5 µmol/mg proteína) (**Figura 14**). Com o intuito de confirmar esses resultados, em colaboração com o grupo do Prof. Moacir Wajner (Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS), quantificou-se a formação de malonato e 2-metilcitrato por cromatografia gasosa/espectrometria de massa, na suspensão mitocondrial de cérebro após 10 minutos de incubação com MMA (10 µmol/mg proteína). Como esperado, a análise revelou a ausência destes ácidos orgânicos (sensibilidade da análise: ~ 1 nmol/mg proteína) (Mirandola et al., 2008).

Em contraste com resultados obtidos sobre o efeito de MMA na oxidação de succinato por mitocôndrias intactas, verificou-se apenas um pequeno efeito inibitório de MMA na respiração de mitocôndrias permeabilizadas (**Figura 12**) ou de partículas submitocondriais invertidas (**Figura 13**). Além disso, não se observou qualquer efeito inibitório de MMA sobre a atividade da SDH em mitocôndrias permeabilizadas com Triton X-100 (**Tabela I**). Em concordância com esta última observação, Kolker et al. (2003) não observaram efeito inibitório de MMA na atividade da SDH em partículas submitocondriais e recentes publicações descreveram apenas uma pequena inibição da atividade de SDH em homogenatos de cérebro na presença de MMA (Brusque et al., 2002; Pettenuzzo et al.,

2006). Estes resultados sugerem que a inibição por MMA do consumo de O<sub>2</sub> mantido por succinato ocorre mais provavelmente devido à inibição do transporte mitocondrial deste substrato. De fato, resultados de nosso grupo indicam que o succinato é transportado pelo carreador de dicarboxilatos em mitocôndrias isoladas de cérebro de rato (Mirandola et al., 2008), como ocorre nas organelas de rins e fígado (Palmieri et al., 1971; Schoolwerth e LaNoue, 1985; Rumbach et al., 1989). Em adição, esses resultados identificaram o MMA como um potente inibidor do transporte mitocondrial de succinato pelo carreador de dicarboxilatos (Mirandola et al., 2008), o que explica a inibição por MMA do consumo de O<sub>2</sub> mantido por succinato em organelas isoladas de cérebro (Maciel et al., 2004; Kowaltowski et al., 2006; **Figura 10**) e fígado (Toyoshima et al., 1995). Por outro lado, mitocôndrias isoladas de músculo apresentam baixa expressão do carreador de dicarboxilatos (Fiermonte et al., 1999). Sendo assim, é mais provável que o transporte de succinato em mitocôndrias de músculo ocorra via transportador de  $\alpha$ -cetoglutarato (Palmieri et al., 1972, Sluse et al., 1971) ou através de outros sistemas de transporte, como o IMAC (Liu et al., 1996a). O mecanismo pelo qual o MMA inibe o transporte de succinato em mitocôndrias isoladas de músculo (**Figura 11**) ainda é desconhecido, mas provavelmente também envolve a competição pela captação mitocondrial de succinato.

Embora o succinato produzido fora da mitocôndria talvez não seja um importante contribuinte para a fosforilação oxidativa, a inibição do carreador de dicarboxilatos mitocondrial pelo MMA pode ter importantes implicações fisiopatológicas, resultando em inibição da gliconeogênese no fígado e rim, indução de estresse oxidativo mitocondrial e em comprometimento do metabolismo energético neuronal e da neurotransmissão glutamatérgica, conforme discutido a seguir.

A inibição do carreador de dicarboxilatos mitocondrial no fígado e rins pelo MMA, provavelmente inibe a gliconeogênese. De fato, Halperin et al. (1971) propuseram que a inibição do transporte de malato através do carreador de dicarboxilatos mitocondrial contribui para a hipoglicemia observada na MMAemia. O malato é o principal substrato metabólico transportado pelo carreador de dicarboxilatos (Schoolwerth e LaNoue, 1985), enquanto que o transporte de succinato ou oxaloacetato por este carreador é menor ou menos compreendido sob condições fisiológicas.

No SNC, onde não ocorre a gliconeogênese, o papel fisiológico do carreador de dicarboxilatos mitocondrial é menos entendido, estando provavelmente associado com o suprimento de substratos para o ciclo do ácido tricarboxílico, uma vez que intermediários deste ciclo são utilizados durante a síntese de glutamato (Hertz, 2004). Em neurônios, não ocorre a síntese *de novo* de intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico, processo que requer a atividade da piruvato carboxilase, enzima presente somente em astrócitos (Yu et al., 1983). Desta forma, o metabolismo energético neuronal e a neurotransmissão glutamatérgica podem ser comprometidos quando o MMA atinge elevadas concentrações no SNC.

Recentemente, um estudo de Morath et al. (2007) sugeriu que a inibição do carreador de dicarboxilatos mitocondrial pelo MMA também pode inibir a entrada de GSH em mitocôndrias renais (Lash, 2006), promovendo estresse oxidativo e insuficiência renal crônica. Isso também pode ocorrer no cérebro, uma vez que estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que o acúmulo de MMA resulta em estresse oxidativo no cérebro (Fighera et al., 1999; Fontella et al., 2000; Malfatti et al., 2003), que é o tecido mais afetado em pacientes com MMAemia.

Conclui-se que os resultados que mostram um efeito inibitório do MMA sobre a atividade da SDH (Dutra et al., 1993; Brusque et al., 2002; Fleck et al., 2004; Pettenuzzo et al., 2006) ou sobre consumo de O<sub>2</sub> mitocondrial mantido por succinato (Toyoshima et al., 1995; Maciel et al., 2004; Kowaltowski et al., 2006) podem ser explicados por um efeito inibitório deste ácido orgânico sobre o transporte de succinato através da membrana e não por um efeito direto na atividade da SDH (Okun et al., 2002; Kolker et al., 2003; Mirandola et al., 2008).

A toxicidade de ácidos orgânicos no SNC foi sugerida há mais de uma década (Hoffmann et al., 1993). O MMA foi o primeiro metabólito a ser considerado neurotóxico na MMAemia. Inicialmente foi considerado ser tóxico à mitocôndria por apresentar similaridades estruturais aos inibidores conhecidos da SDH (complexo II da cadeia respiratória): ácido malônico e ácido 3-nitropropiónico (Halperin et al., 1971; Dutra et al., 1993; Wajner e Coelho, 1997). No entanto, no presente trabalho mostrou-se que o MMA inibe o transporte mitocondrial de succinato, mas não a SDH. Por outro lado, uma inibição

parcial do complexo II da cadeia transportadora de elétrons pode estar envolvida na fisiopatologia da lesão cardíaca após um evento isquêmico transitório (Chen et al., 2007), em alguns casos de encefalopatia na infância (Brière et al., 2005) e na neurodegeneração observada em doenças genéticas, como na doença de Huntington (Brouillet et al., 2005) e na síndrome de Leigh (Bourgeron et al., 1995). Assim, na *terceira parte* deste trabalho, investigamos o efeito de uma inibição parcial do complexo II da cadeia respiratória na indução da disfunção mitocondrial por MPT em organelas isoladas de diferentes tecidos de ratos adultos.

Para que se inibisse parcialmente o complexo II da cadeia respiratória mitocondrial, utilizou-se o 3-NP, um inibidor não competitivo e irreversível da SDH (Ludolph et al., 1991; Brouillet et al., 2005; Huang et al., 2006). Em mitocôndrias isoladas de cérebro e coração de rato, os resultados encontrados mostraram que uma pequena inibição (10 a 20 %) da respiração por 3-NP foi suficiente para resultar em perda do  $\Delta\Psi$  (**Figuras 17, 18, 20 e 21**) e inchamento mitocondrial (**Figura 18**), na presença de concentrações micromolares de  $\text{Ca}^{2+}$ . Demonstrou-se que estas alterações mitocondriais foram devidas à indução de MPT, pois foram completamente prevenidas por CsA e ADP, inibidores desse fenômeno. Uma maior suscetibilidade a MPT induzida por  $\text{Ca}^{2+}$  também foi observada em mitocôndrias isoladas de cérebro, quando o tratamento com 3-NP foi conduzido *in vivo* ( $25 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$  animal, i.p.) (**Figura 16**). Em adição, a potencialização pelo 3-NP do efeito do  $\text{Ca}^{2+}$  na indução da MPT foi observada mesmo na presença de concentrações fisiológicas de  $\text{Mg}^{2+}$  e ATP, inibidores fisiológicos da MPT (**Figura 19**). Estes resultados indicam que a indução da MPT pode contribuir para a neurodegeneração induzida por 3-NP.

O fato de mitocôndrias de coração serem bastante suscetíveis à MPT, na presença de 3-NP, pode estar relacionado ao efeito cardiotoxico observado em camundongos tratados com esta toxina (Gabrielson et al., 2001). A toxicidade cardíaca pelo 3-NP também pode ser resultado direto da inibição do metabolismo oxidativo, pois este órgão possui grande dependência da produção de ATP pela fosforilação oxidativa. Por outro lado, mitocôndrias de fígado e rim requeram uma maior inibição da cadeia respiratória mitocondrial por 3-NP para que a MPT ocorresse (**Figuras 20 e 21**), sugerindo uma maior

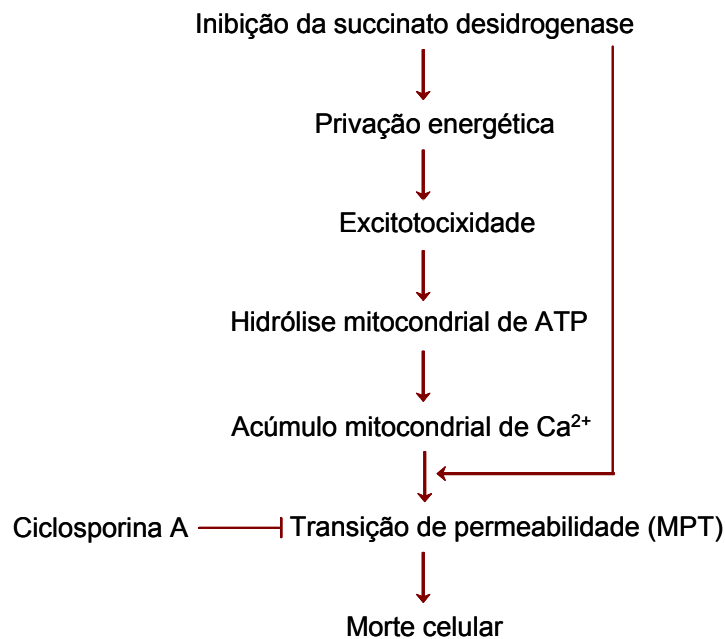
sensibilidade das mitocôndrias de cérebro e de coração à indução da MPT pela inibição parcial do complexo II.

Utilizando mitocôndrias isoladas de diferentes estruturas cerebrais, observou-se que organelas obtidas do corpo estriado foram mais suscetíveis à MPT na presença de 3-NP e  $\text{Ca}^{2+}$  que aquelas isoladas de córtex e cerebelo (**Figura 22**). Este resultado está de acordo com o padrão de neurodegeneração observado em roedores tratados com 3-NP, onde as estruturas mais acometidas são o corpo estriado (núcleo caudato e putamen) e hipocampo (Hamilton e Gould, 1987; Brouillet et al., 1999, 2005). É importante notar que, quando ratos foram tratados sistemicamente com 3-NP ( $25 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$  animal, i.p.), todos os tecidos e regiões cerebrais estudados (**Figura 15**) apresentam padrão semelhante de inibição da SDH. Este resultado sugere que o fato de alguns tecidos serem mais suscetíveis a lesões após tratamento sistêmico com 3-NP, não pode ser explicado por uma maior inibição da SDH nestes locais.

Uma maior susceptibilidade de mitocôndrias de cérebro, em comparação a mitocôndrias de rim e fígado, a MPT induzida pela inibição parcial da SDH (por malonato) e concentrações micromolares de  $\text{Ca}^{2+}$  já havia sido descrita num trabalho anterior de nosso grupo (Maciel et al., 2004). No entanto, neste trabalho anterior não foi feito um estudo mais detalhado do efeito de diferentes porcentagens de inibição da SDH e da susceptibilidade de outros tecidos e regiões cerebrais à MPT induzida por  $\text{Ca}^{2+}$  e inibição da SDH.

O mecanismo de potencialização por 3-NP do efeito do  $\text{Ca}^{2+}$  em induzir a MPT ainda não é totalmente claro. Resultados anteriores (Maciel et al., 2004) e do presente trabalho sugerem que uma diminuição do transporte de elétrons pela succinato desidrogenase (SDH) poderia levar a mitocôndria a uma maior sensibilidade a oxidantes endógenos quando a captação e acúmulo de  $\text{Ca}^{2+}$  é mediada pelo  $\Delta\Psi$ . Assim, em condições em que a respiração mitocondrial está parcialmente inibida, o aumento no transporte de elétrons devido à captação de  $\text{Ca}^{2+}$  levaria ao estresse oxidativo e à MPT (Maciel et al., 2004). Sugere-se que alterações no estado de óxido-redução da coenzima Q podem estar relacionadas com a maior susceptibilidade de mitocôndrias à MPT nestas condições.

Sabe-se que o tecido estriatal pode apresentar maior risco para excitotoxicidade e dano oxidativo pela presença de uma alta densidade de terminais nervosos glutamatérgicos e dopaminérgicos (Cepeda e Levine, 1998; Jakel e Maragos, 2000). Assim, estes neurônios são mais suscetíveis ao influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  mediado pelos receptores NMDA (Albin e Greenamyre, 1992; Greene et al., 1998). Condição em que as mitocôndrias podem captar e acumular grandes quantidades de  $\text{Ca}^{2+}$  (Wang e Thayer, 1996; Castilho et al., 1998; Nicholls e Budd, 2000). Assim, propõe-se que a maior suscetibilidade do corpo estriado à neurodegeneração induzida por 3-NP (Hamilton e Gould, 1987; Brouillet et al., 1999, Brouillet et al., 2005) pode ser, pelo menos em parte, explicada por uma maior vulnerabilidade desta região do cérebro à MPT, juntamente com a vulnerabilidade desta região ao influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico mediado pelo estímulo de receptores de glutamato (Figura 23).



**Figura 23 – Proposta de eventos envolvidos na morte neuronal induzida pela inibição parcial da enzima SDH.** A inibição parcial da SDH resulta em privação energética neuronal, o que leva a liberação de glutamato para o meio extracelular e conseqüente influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico mediado pelo hiperestímulo de receptores de glutamato (excitotoxicidade). Nesta condição, a hidrólise mitocondrial de ATP resulta em restauração do  $\Delta\psi$  e captação de  $\text{Ca}^{2+}$ . O acúmulo mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$ , na presença de uma inibição parcial da SDH, torna estas organelas suscetíveis à MPT, um fenômeno associado com disfunção mitocondrial e morte celular.

## *6. Conclusões*

## **Conclusões:**

**1** - O MMA é um importante inibidor competitivo da conversão de lactato a piruvato catalisada pela LDH. Este efeito de MMA pode contribuir para a fisiopatologia da MMAemia, resultando, dentre outras alterações, em acúmulo de lactato em tecidos e acidemia metabólica.

**2** - O MMA é um inibidor do transporte mitocondrial de dicarboxilatos. Esta propriedade do MMA explica a inibição do consumo mitocondrial de  $O_2$  na presença de succinato. Esses resultados confirmam que o MMA não é um inibidor da enzima SDH. A inibição do transporte mitocondrial de dicarboxilatos por MMA pode ter importantes implicações fisiopatológicas na MMAemia.

**3** - Mitocôndrias de cérebro e coração são mais suscetíveis à MPT induzida por  $Ca^{2+}$  e 3-NP, um inibidor irreversível da SDH, que organelas isoladas de fígado e rim de ratos adultos. Mitocôndrias de corpo estriado são mais suscetíveis à MPT induzida por  $Ca^{2+}$  e 3-NP que organelas isoladas de córtex ou cerebelo. Propõe-se que a maior suscetibilidade do corpo estriado à neurodegeneração induzida pela administração sistêmica de 3-NP pode ser, pelo menos em parte, explicada por uma maior vulnerabilidade desta região do cérebro à MPT, juntamente com a vulnerabilidade desta região ao influxo de  $Ca^{2+}$  citosólico mediado pelo estímulo de receptores de glutamato.



## *7. Referências Bibliográficas*

Åkerman KEO, Wikström MKF. Safranine as a probe of the mitochondrial membrane potencial. FEBS Lett 1976; 68: 191-7.

Albin RL, Greenamyre JT. Alternative excitotoxic hypotheses. Neurology 1992; 42: 733-8.

Alston TA, Mela L, Bright HJ. 3-Nitropropionate, the toxic substance of *Indigofera*, is a suicide inactivator of succinate dehydrogenase. Proc Natl Acad Sci USA 1977; 74: 3767-71.

Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, Osinska H, Hambleton MA et al. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. Nature 2005; 434: 658-62.

Baumgartner ER, Viardot C. Long-term follow-up of 77 patients with isolated methylmalonic acidemia. J Inherit Metab Dis 1995; 18: 138-42.

Baysal K, Jung DW, Gunter KK, Gunter TE, Brierley GP. Na(+)-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  efflux mechanism of heart mitochondria is not a passive  $\text{Ca}^{2+}/2\text{Na}^{+}$  exchanger. Am J Physiol 1994; 266: C800-8.

Beal MF. Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration. Ann Neurol 2005; 58: 495-505.

Beal MF, Brouillet E, Jenkins BG, Ferrante RJ, Kowall NW, Miller JM, Storey E, Srivastava R, Rosen BR, Hyman BT. Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. J Neurosci 1993; 13: 4181-92.

Beavis AD, Brannan RD, Garlid KD. Swelling and contraction of the mitochondrial matrix. I. A structural interpretation of the relationship between light scattering and matrix volume. J Biol Chem 1985; 260: 13424-33.

Bertoli-Avella AM, Oostra BA, Heutink P. Chasing genes in Alzheimer's and Parkinson's disease. Hum Genet 2004; 114: 413-38.

Beutner G, Ruck A, Riede B, Welte W, Brdiczka D. Complexes between kinases, mitochondrial porin and adenylate translocator in rat brain resemble the permeability transition pore. FEBS Lett 1996; 396: 189-95.

Bittar PG, Charnay Y, Pellerin L, Bouras C, Magistretti PJ. Selective distribution of lactate dehydrogenase isoenzymes in neurons and astrocytes of human brain. J Cereb Blood Flow Metab 1996; 16: 1079-89.

Bossy-Wetzel E, Schwarzenbacher R, Lipton SA. Molecular pathways to neurodegeneration. Nat Med 2004; 10 Suppl: S2-9.

Bourgeron T, Rustin P, Chretien D, Birch-Machin M, Bourgeois M, Viegas-Péquignot E et al. Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency. Nat Genet 1995; 11: 144-9.

Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. Biochem J 1973; 134: 707-16.

Brière JJ, Favier J, El Ghouzzi V, Djouadi F, Bénit P, Gimenez AP, Rustin P. Succinate dehydrogenase deficiency in human. Cell Mol Life Sci 2005; 62: 2317-24.

Brismar J, Ozand PT. CT and MR of the brain in disorders of the propionate and methylmalonate metabolism. AJNR Am J Neuroradiol 1994; 15: 1459-73.

Broekemeier KM, Dempsey ME, Pfeiffer DR. Cyclosporin A is a potent inhibitor of the inner membrane permeability transition in liver mitochondria. J Biol Chem 1989; 264: 7826-30.

Brooks GA, Dubouchaud H, Brown M, Sicurello JP, Butz CE. Role of mitochondrial lactate dehydrogenase and lactate oxidation in the intracellular lactate shuttle. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96: 1129-34.

Brouillet E, Hantraye P, Ferrante RJ, Dolan R, Leroy-Willig A, Kowall NW, Beal MF. Chronic mitochondrial energy impairment produces selective striatal degeneration and abnormal choreiform movements in primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 7105-09.

Brouillet E, Guyot MC, Mittoux V, Altairac S, Condé F, Palfi S et al. Partial inhibition of brain succinate dehydrogenase by 3-nitropropionic acid is sufficient to initiate striatal degeneration in rat. *J Neurochem* 1998; 70: 794-805.

Brouillet E, Condé F, Beal MF, Hantraye P. Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals. *Prog Neurobiol* 1999; 59: 427-68.

Brouillet E, Jacquard C, Bizat N, Blum D. 3-Nitropropionic acid: a mitochondrial toxin to uncover physiopathological mechanisms underlying striatal degeneration in Huntington's disease. *J Neurochem*. 2005; 95: 1521-40.

Brusque AM, Borba Rosa R, Schuck PF, Dalcin KB, Ribeiro CA, Silva CG et al. Inhibition of the mitochondrial respiratory chain complex activities in rat cerebral cortex by methylmalonic acid. *Neurochem Int* 2002; 40: 593-601.

Burns SP, Iles RA, Saudubray JM, Chalmers RA. Propionylcarnitine excretion is not affected by metronidazole administration to patients with disorders of propionate metabolism. *Eur J Pediatr* 1996; 155: 31-5.

Butterfield DA, Kanski J. Brain protein oxidation in age-related neurodegenerative disorders that are associated with aggregated proteins. *Mech Ageing Dev* 2001; 122: 945-62.

Carafoli E. Intracellular calcium homeostasis. *Annu Rev Biochem* 1987; 56: 395-433.

Castilho RF, Kowaltowski AJ, Meinicke AR, Bechara EJ, Vercesi AE. Permeabilization of the inner mitochondrial membrane by  $\text{Ca}^{2+}$  ions is stimulated by t-butyl hydroperoxide and mediated by reactive oxygen species generated by mitochondria. *Free Radic Biol Med* 1995; 18: 479-86.

Castilho RF, Kowaltowski AJ, Vercesi AE. The irreversibility of inner mitochondrial membrane permeabilization by  $\text{Ca}^{2+}$  plus prooxidants is determined by the extent of membrane protein thiol cross-linking. *J Bioenerg Biomembr* 1996; 28: 523-9.

Castilho RF, Hansson O, Ward MW, Budd SL, Nicholls DG. Mitochondrial control of acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. *J Neurosci* 1998; 18: 10277-86.

Cepeda C, Levine MS. Dopamine and *N*-methyl-D-aspartate receptor interactions in the neostriatum. *Dev Neurosci* 1998; 20: 1-18.

Chance B, Williams GR. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I: Kinetics of oxygen utilization. *J Biol Chem* 1955; 217: 383-93.

Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 1979; 59: 527-605.

Chandler RJ, Venditti CP. Genetic and genomic systems to study methylmalonic acidemia. *Mol Genet Metab* 2005; 86: 34-43.

Chen YR, Chen CL, Pfeiffer DR, Zweier JL. Mitochondrial complex II in the post-ischemic heart: oxidative injury and the role of protein S-glutathionylation. *J Biol Chem* 2007; 282: 32640-54.

Choi DW. Excitotoxic Cell Death. *Journal of Neurobiology* 1992; 23: 1261-76.

Clapham DE. Calcium signaling. *Cell* 2007; 131: 1047-58.

Coles CJ, Edmondson DE, Singer TP. Inactivation of succinate dehydrogenase by 3-nitropropionate. *J Biol Chem* 1979; 254: 5161-7.

Connern CP, Halestrap AP. Recruitment of mitochondrial cyclophilin to the mitochondrial inner membrane under conditions of oxidative stress that enhance the opening of a calcium-sensitive non-specific channel. *Biochem J* 1994; 302: 321-4.

Coulombe JT, Shih VE, Levy HL. Massachusetts Metabolic Disorders Screening Program. II. Methylmalonic aciduria. *Pediatrics* 1981; 67: 26-31.

Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 1993; 262: 689-95.

Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 1999; 341: 233-49.

Crompton M, Ellinger H, Costi A. Inhibition by cyclosporin A of a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. *Biochem J* 1988; 255: 357-60.

Crompton M, Virji S, Ward JM. Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore. *Eur J Biochem*. 1998; 258: 729-35.

Crompton M. Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their role in cell death. *J Physiol* 2000; 529.1: 11-21.

Crompton M, Barksby E, Johnson N, Capano M. Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their involvement in cell death. *Biochimie* 2002; 84: 143-52.

Dawson VL, Dawson TM. Free radicals and neuronal cell death. *Cell Death Differ* 1996; 3: 71-8.

de Mello CF, Begnini J, Jiménez-Bernal RE, Rubin MA, de Bastiani J, da Costa E Jr et al. Intrastriatal methylmalonic acid administration induces rotational behavior and convulsions through glutamatergic mechanisms. *Brain Res* 1996; 721: 120-5.

Deitmer JW. Strategies for metabolic exchange between glial cells and neurons. *Respir Physiol* 2001; 129: 71-81.

Devlin TM. Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas. São Paulo: Ed. Edgard Blücher Ltda; 2003.

Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 2000; 102: 33-42.

Dutra JC, Dutra-Filho CS, Cardozo SE, Wannmacher CM, Sarkis JJ, Wajner M. Inhibition of succinate dehydrogenase and beta-hydroxybutyrate dehydrogenase activities by methylmalonate in brain and liver of developing rats. *J Inherit Metab Dis* 1993; 16: 147-53.

Fagian MM, Pereira-da-Silva L, Martins IS, Vercesi AE. Membrane protein thiol cross-linking associated with the permeabilization of the inner mitochondrial membrane by  $\text{Ca}^{2+}$  plus prooxidants. *J Biol Chem* 1990; 265: 19955-60.

Faustin B, Rossignol R, Rocher C, Bénard G, Malgat M, Letellier T. Mobilization of adenine nucleotide translocators as molecular bases of the biochemical threshold effect observed in mitochondrial diseases. *J Biol Chem*. 2004; 279: 20411-21.

Fenton WA, Gravel RAA, Rosenblatt DS. Disorders of propionate and methylmalonate metabolism. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8<sup>th</sup> Edition. New York: McGraw-Hill, 2001; 2165-193.

Fiermonte G, Dolce V, Arrigoni R, Runswick MJ, Walker JE, Palmieri F. Organization and sequence of the gene for the human mitochondrial dicarboxylate carrier: evolution of the carrier family. *Biochem J* 1999; 344: 953-60.

Figuera MR, Queiroz CM, Stracke MP, Brauer MC, González-Rodríguez LL, Frussa-Filho R, et al. Ascorbic acid and alpha-tocopherol attenuate methylmalonic acid-induced convulsions. *Neuroreport* 1999; 10: 2039-43.

Fleck J, Ribeiro MC, Schneider CM, Sinhoro VD, Rubin MA, Mello CF. Intrastriatal malonate administration induces convulsive behaviour in rats. *J Inherit Metab Dis* 2004; 27: 211-9.

Flohe L, Günzler WA, Schock HH. Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. FEBS Lett 1973; 32: 132-4.

Fontella FU, Pulrolnik V, Gassen E, Wannmacher CM, Klein AB, Wajner M, Dutra-Filho CS. Propionic and L-methylmalonic acids induce oxidative stress in brain of young rats. Neuroreport 2000; 11: 541-4.

Frei B, Winterhalter KH, Richter C. Mechanism of alloxan-induced calcium release from rat liver mitochondria. J Biol Chem 1985; 260: 7394-401.

Fridovich I. The biology of oxygen radicals. Science 1978; 201: 875-80.

Fukuda A, Deshpande SB, Shimano Y, Nishino H. Astrocytes are more vulnerable than neurons to cellular  $\text{Ca}^{2+}$  overload induced by a mitochondrial toxin, 3-nitropropionic acid. Neuroscience 1998; 87: 497-507.

Gabrielson KL, Hogue BA, Bohr VA, Cardounel AJ, Nakajima W, Kofler J et al. Mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid induces cardiac and neurotoxicity differentially in mice. Am J Pathol 2001; 159: 1507-20.

Gladden LB. Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium. J Physiol 2004; 558: 5-30.

Gornall AG, Bardawill CJ, Donid MM. Determination of serum protein by means of the Biuret reaction. J Biol Chem 1949; 177: 751-66.

Green RC, O'Brien PJ. The cellular localisation of glutathione peroxidase and its release from mitochondria during swelling. Biochim Biophys Acta 1970; 197: 31-9.

Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. Science 1998; 281: 1309-12.

Greene JG, Sheu SS, Gross RA, Greenamyre JT. 3-Nitropropionic acid exacerbates N-methyl-D-aspartate toxicity in striatal culture by multiple mechanisms. Neuroscience 1998; 84: 503-10.



Gunter KK, Gunter TE. Transport of calcium by mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 1994; 26: 471-85.

Gunter TE, Yule DI, Gunter KK, Eliseev RA, Salter JD. Calcium and mitochondria. *FEBS Lett* 2004; 567: 96-102.

Halestrap AP. Mitochondrial permeability: dual role for the ADP/ATP translocator? *Nature* 2004; 430: 1.

Halestrap AP. A pore way to die. *Nature* 2005; 434: 578-9.

Halestrap AP. Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die. *Biochem Soc Trans* 2006; 34: 232-7.

Halestrap AP, Woodfield KY, Connern CP. Oxidative stress, thiol reagents, and membrane potential modulate the mitochondrial permeability transition by affecting nucleotide binding to the adenine nucleotide translocase. *J Biol Chem* 1997; 272: 3346-54.

Halestrap AP, McStay GP, Clarke SJ. The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie* 2002; 84: 153-66.

Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 1984; 219: 1-14.

Halliwell B, Gutteridge JM. Lipid peroxidation in brain homogenates: the role of iron and hydroxyl radicals. *J Neurochem* 1997; 69: 1330-1.

Halperin ML, Schiller CM, Fritz IB. The inhibition by methylmalonic acid of malate transport by the dicarboxylate carrier in rat liver mitochondria. A possible explanation for hypoglycemia in methylmalonic aciduria. *J Clin Invest* 1971; 50: 2276-82.

Hamilton BF, Gould DH. Nature and distribution of brain lesions in rats intoxicated with 3-nitropropionic acid: a type of hypoxic (energy deficient) brain damage. *Acta Neuropathol* 1987; 72: 286-97.

Harmon HJ. Isolation of totally inverted submitochondrial particles by sonication of beef heart mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 1982; 14: 377-86.

He K, Ludtke SJ, Worcester DL, Huang HW. Neutron scattering in the plane of membranes: structure of alamethicin pores. *Biophys J* 1996; 70: 2659-66.

He L, Lemasters JJ. Regulated and unregulated mitochondrial permeability transition pores: a new paradigm of pore structure and function? *FEBS Lett* 2002; 512: 1-7.

Hermes-Lima M, Pereira B, Bechara EJ. Are free radicals involved in lead poisoning? *Xenobiotica* 1991;21: 1085-90.

Hertz L. Intercellular metabolic compartmentation in the brain: past, present and future. *Neurochem Int* 2004; 45: 285-96.

Hoffmann GF, Meier-Augenstein W, Stöckler S, Surtees R, Rating D, Nyhan WL. Physiology and pathophysiology of organic acids in cerebrospinal fluid. *J Inherit Metab Dis* 1993; 16: 648-69.

Hoffmann GF, Gibson KM, Trefz FK, Nyhan WL, Bremer HJ, Rating D. Neurological manifestations of organic acid disorders. *Eur J Pediatr* 1994; 153: S94-100.

Huang LS, Sun G, Cobessi D, Wang AC, Shen JT, Tung EY, Anderson VE, Berry EA. 3-nitropropionic acid is a suicide inhibitor of mitochondrial respiration that, upon oxidation by complex II, forms a covalent adduct with a catalytic base arginine in the active site of the enzyme. *J Biol Chem* 2006; 281: 5965-72.

Hunter DE, Haworth RA, Southard JH. Relationship between configuration, function and permeability in calcium-treated mitochondria. *J Biol Chem* 1976; 251: 5069-77.

Hunter DR, Haworth RA. The Ca-induced membrane transition in mitochondria I: The protective mechanisms. *Arch Biochem Biophys* 1979; 195: 453-59.

Jakel RJ, Maragos WF. Neuronal cell death in Huntington's disease: a potential role for dopamine. *Trends Neurosci* 2000; 23: 239-45.

Kaplan NO, Everse J. Regulatory characteristics of lactate dehydrogenases. *Adv Enzyme Regul* 1972; 10: 323-36.

Kanaumi T, Takashima S, Hirose S, Kodama T, Iwasaki H. Neuropathology of methylmalonic acidemia in a child. *Pediatr Neurol* 2006; 34: 156-9.

Keller JN, Guo Q, Holtsberg FW, Bruce-Keller AJ, Mattson MP. Increased sensitivity to mitochondrial toxin-induced apoptosis in neural cells expressing mutant presenilin-1 is linked to perturbed calcium homeostasis and enhanced oxyradical production. *J Neurosci* 1998; 18: 4439-50.

Kim JS, He L, Qian T, Lemasters JJ. Role of the mitochondrial permeability transition in apoptotic and necrotic death after ischemia/reperfusion injury to hepatocytes. *Curr Mol Med* 2003; 3: 527-35.

Kolker S, Schwab M, Horster F, Sauer S, Hinz A, Wolf NI et al. Methylmalonic acid, a biochemical hallmark of methylmalonic acidurias but no inhibitor of mitochondrial respiratory chain. *J Biol Chem* 2003; 278: 47388-93.

Kolker S, Okun JG. Methylmalonic acid - an endogenous toxin? *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 621-4.

Kolker S, Sauer SW, Surtees RA, Leonard JV. The aetiology of neurological complications of organic acidurias--a role for the blood-brain barrier. *J Inher Metab Dis* 2006; 29: 701-4.

Kowaltowski AJ, Naia-da-Silva ES, Castilho RF, Vercesi AE.  $\text{Ca}^{2+}$ -stimulated mitochondrial reactive oxygen species generation and permeability transition are inhibited by dibucaine or  $\text{Mg}^{2+}$ . *Arch Biochem Biophys* 1998; 359: 77-81.

Kowaltowski AJ, Netto LE, Vercesi AE. The thiol-specific antioxidant enzyme prevents mitochondrial permeability transition. Evidence for the participation of reactive oxygen species in this mechanism. *J Biol Chem* 1998; 273: 12766-9.

Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett* 2001; 495: 12-5.

Kowaltowski AJ, Maciel EN, Fornazari M, Castilho RF. Diazoxide protects against methylmalonate-induced neuronal toxicity. *Exp Neurol* 2006; 201: 165-71.

Krajewski S, Krajewska M, Ellerby LM, Welsh K, Xie Z, Deveraux QL, Salvesen GS, Bredesen DE, Rosenthal RE, Fiskum G, Reed JC. Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 5752-7.

Kristián T, Weatherby TM, Bates TE, Fiskum G. Heterogeneity of the calcium-induced permeability transition in isolated non-synaptic brain mitochondria. *J Neurochem* 2002; 83: 1297-308.

Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 2007; 87: 99-163.

Larnaout A, Mongalgi MA, Kaabachi N, Khiari D, Debbabi A, Mebazza A et al. Methylmalonic acidemia with bilateral globus pallidus involvement: a neuropathological study. *J Inherit Metab Dis* 1998; 21: 639-44.

Lash LH. Mitochondrial glutathione transport: physiological, pathological and toxicological implications. *Chem Biol Interact* 2006; 163: 54-67.

Lehmann HP, Henry JB. SI Units. In: Henry JB (ed) *Clinical diagnosis and management by laboratory methods*, 20<sup>th</sup> edn. W.B. Saunders Company, Philadelphia, USA 2001; pp 1426-41.

Lemasters JJ, Nieminen AL, Qian T, Trost LC, Elmore SP, Nishimura Y et al. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1366: 177-96.

Leung AW, Halestrap AP. Recent progress in elucidating the molecular mechanism of the mitochondrial permeability transition pore. *Biochim Biophys Acta* 2008; doi:10.1016/j.bbabo.2008.03.009.

Leventhal L, Sortwell CE, Hanbury R, Collier TJ, Kordower JH, Palfi S. Cyclosporin A protects striatal neurons in vitro and in vivo from 3-nitropropionic acid toxicity. *J Comp Neurol* 2000; 425: 471-8.

Lin MT, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 2006; 443: 787-95.

Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* 1999; 79: 1431-568.

Liu G, Hinch B, Beavis AD. Mechanisms for the transport of alpha,omega-dicarboxylates through the mitochondrial inner membrane. *J Biol Chem* 1996a; 271: 25338-44.

Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 1996b; 86: 147-57.

Ludolph AC, He F, Spencer PS, Hammerstad J, Sabri M. 3-Nitropropionic acid-exogenous animal neurotoxin and possible human striatal toxin. *Can J Neurol Sci* 1991; 18: 492-8.

Maciel EN, Kaminski Schierle GS, Hansson O, Brundin P, Castilho RF Cyclosporin A and Bcl-2 do not inhibit quinolinic acid-induced striatal excitotoxicity in rodents. *Exp Neurol* 2003; 83: 430-7.

Maciel EN, Kowaltowski AJ, Schwalm FD, Rodrigues JM, Souza DO, Vercesi AE et al. Mitochondrial permeability transition in neuronal damage promoted by  $\text{Ca}^{2+}$  and respiratory chain complex II inhibition. *J Neurochem* 2004; 90: 1025-35.

Malfatti CR, Royes LF, Francescato L, Sanabria ER, Rubin MA, Cavaleiro EA, Mello CF. Intrastratial methylmalonic acid administration induces convulsions and TBARS production, and alters  $\text{Na}^{+}, \text{K}^{+}$ -ATPase activity in the rat striatum and cerebral cortex. *Epilepsia* 2003; 44: 761-7.

McLaughlin BA, Nelson D, Silver IA, Erecinska M, Chesselet MF Methylmalonate toxicity in primary neuronal cultures. *Neuroscience* 1998; 86: 279-90.

Mirandola SR, Melo DR, Schuck PF, Ferreira GC, Wajner M, Castilho RF. Methylmalonate inhibits succinate-supported oxygen consumption by interfering with mitochondrial succinate uptake. *J Inherit Metab Dis* 2008; 31: 44-54.

Mitchell P. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biol Rev Camb Philos Soc* 1966; 41: 445-502.

Morath MA, Okun JG, Müller IB, Sauer SW, Hörster F, Hoffmann GF, Kölker S. Neurodegeneration and chronic renal failure in methylmalonic aciduria - A pathophysiological approach. *J Inherit Metab Dis* 2008; 31: 35-43.

Nakagawa T, Shimizu S, Watanabe T, Yamaguchi O, Otsu K, Yamagata H et al. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* 2005; 434: 652-8.

Nicholls DG, Budd SL. Mitochondria and neuronal survival. *Physiol Rev* 2000; 80: 315-60.

Nordström CH, Siesjö BK. Effects of phenobarbital in cerebral ischemia. Part I: cerebral energy metabolism during pronounced incomplete ischemia. *Stroke* 1978; 9: 327-35.

Oberholzer VG, Levin B, Burgess EA, Young WF. Methylmalonic aciduria. An inborn error of metabolism leading to chronic metabolic acidosis. *Arch Dis Child* 1967; 42: 492-504.

Ogier de Baulny H, Saudubray JM. Branched-chain organic acidurias. *Semin Neonatol* 2002; 7: 65-74.

Okun JG, Horster F, Farkas LM, Feyh P, Hinz A, Sauer S et al. Neurodegeneration in methylmalonic aciduria involves inhibition of complex II and the tricarboxylic acid cycle, and synergistically acting excitotoxicity. *J Biol Chem* 2002; 277: 14674-80.

Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 552-65.

Palmieri F, Prezioso G, Quagliariello E, Klingenberg M. Kinetic study of the dicarboxylate carrier in rat liver mitochondria. *Eur J Biochem* 1971; 22: 66-74.

Palmieri F, Quagliariello E, Klingenger M. Kinetics and specificity of the oxoglutarate carrier in rat-liver mitochondria. *Eur J Biochem* 1972; 29: 408-16.

Parrish J, Li L, Klotz K, Ledwich D, Wang X, Xue D. Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in *C. elegans*. *Nature* 2001; 412: 90-4.

Pellerin L, Magistretti PJ. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 10625-9.

Petronilli V, Miotto G, Canton M, Brini M, Colonna R, Bernardi P, Di Lisa F. Transient and long-lasting openings of the mitochondrial permeability transition pore can be monitored directly in intact cells by changes in mitochondrial calcein fluorescence. *Biophys J* 1999; 76: 725-34.

Pettenuzzo LF, Ferreira Gda C, Schmidt AL, Dutra-Filho CS, Wyse AT, Wajner M. Differential inhibitory effects of methylmalonic acid on respiratory chain complex activities in rat tissues. *Int J Dev Neurosci* 2006; 24: 45-52.

Piret JP, Arnould T, Fuks B, Chatelain P, Remacle J, Michiels C. Caspase activation precedes PTP opening in TNF- $\alpha$ -induced apoptosis in L929 cells. *Mitochondrion* 2004; 3: 261-78.

Radi R, Turrens JF, Chang LY, Bush KM, Crapo JD, Freeman BA. Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J Biol Chem* 1991; 266: 22028-34.

Ravagnan L, Roumier T, Kroemer G. Mitochondria, the killer organelles and their weapons. *J Cell Physiol* 2002; 192: 131-7.

Rhee SG, Kim KH, Chae HZ, Yim MB, Uchida K, Netto LE et al. Antioxidant defense mechanisms: a new thiol-specific antioxidant enzyme. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 738: 86-92.

Ribeiro MC, de Avila DS, Schneider CY, Hermes FS, Furian AF, Oliveira MS et al. alpha-Tocopherol protects against pentylentetrazol- and methylmalonate-induced convulsions. *Epilepsy Res* 2005; 66: 185-94.

Robinson BH, Chappell JB. The inhibition of malate, tricarboxylate and oxoglutarate entry into mitochondria by 2-n-butylmalonate. *Biochem Biophys Res Commun* 1967; 28: 249-55.

Robinson J e Cooper JM. Method of determining oxygen concentrations in biological media, suitable for calibration of the oxygen electrode. *Anal Biochem* 1971; 33: 390-9.

Roodhooft AM, Baumgartner ER, Martin JJ, Blom W, Van Acker KJ. Symmetrical necrosis of the basal ganglia in methylmalonic acidemia. *Eur J Pediatr* 1990; 149: 582-4.

Rosenstock TR, Carvalho AC, Jurkiewicz A, Frussa-Filho R, Smaili SS. Mitochondrial calcium, oxidative stress and apoptosis in a neurodegenerative disease model induced by 3-nitropropionic acid. *J Neurochem* 2004; 88: 1220-8.

Rosenthal RE, Hamud F, Fiskum G, Varghese PJ, Sharpe S. Cerebral ischemia and reperfusion: prevention of brain mitochondrial injury by lidoflazine. *J Cereb Blood Flow Metab* 1987; 7: 752-8.

Royes LF, Figuera MR, Furian AF, Oliveira MS, da Silva LG, Malfatti CR et al. Creatine protects against the convulsive behavior and lactate production elicited by the intrastriatal injection of methylmalonate. *Neuroscience* 2003; 118: 1079-90.

Ruan Q, Lesort M, MacDonald ME, Johnson GV. Striatal cells from mutant huntingtin knock-in mice are selectively vulnerable to mitochondrial complex II inhibitor-induced cell death through a non-apoptotic pathway. *Hum Mol Genet* 2004; 13: 669-81.



Rumbach L, Cremel G, Marescaux C, Warter JM, Waksman A. Succinate transport inhibition by valproate in rat renal mitochondria. *Eur J Pharmacol* 1989; 164: 577-81.

Saad LO, Mirandola SR, Maciel EN, Castilho RF. Lactate dehydrogenase activity is inhibited by methylmalonate in vitro. *Neurochem Res* 2006; 31: 541-8.

Salvi M, Battaglia V, Brunati AM, La Rocca N, Tibaldi E, Pietrangeli P, Marcocci L, Mondovì B, Rossi CA, Toninello A. Catalase takes part in rat liver mitochondria oxidative stress defense. *J Biol Chem* 2007; 282: 24407-15.

Santos AC, Uyemura SA, Lopes JL, Bazon JN, Mingatto FE, Curti C. Effect of naturally occurring flavonoids on lipid peroxidation and membrane permeability transition in mitochondria. *Free Radic Biol Med* 1998; 24: 1455-61.

Schneider WC e Hogeboom GH. Cytochemical studies of mammalian tissues: the isolation of cell components by differential centrifugation: a review. *Cancer Res* 1951; 11: 1-22.

Schoolwerth AC, LaNoue KF. Transport of metabolic substrates in renal mitochondria. *Annu Rev Physiol* 1985; 47: 143-71.

Schuck PF, Rosa RB, Pettenuzzo LF, Sitta A, Wannmacher CM, Wyse AT et al. Inhibition of mitochondrial creatine kinase activity from rat cerebral cortex by methylmalonic acid. *Neurochem Int* 2004; 45: 661-7.

Singer TP. Determination of the activity of succinate, NADH, choline, and alpha-glycerophosphate dehydrogenases. *Methods Biochem Anal* 1974; 22: 123-75.

Sluse FE, Meijer AJ, Tager JM. Anion translocators in rat-heart mitochondria. *FEBS Lett* 1971; 18: 149-153.

Smaili SS, Hsu YT, Sanders KM, Russell JT, Youle RJ. Bax translocation to mitochondria subsequent to a rapid loss of mitochondrial membrane potential. *Cell Death Differ* 2001; 8: 909-20.

Smaili SS, Hsu YT, Carvalho AC, Rosenstock TR, Sharpe JC, Youle RJ. Mitochondria, calcium and pro-apoptotic proteins as mediators in cell death signaling. *Braz J Med Biol Res* 2003; 36: 183-90.

Stadtman ER. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radic Biol Med* 1990; 9: 315-25.

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999; 397: 441-6.

Sweetman L, Williams JC. Branched chain organic acidurias. In: Scriver, C. R.; Beaudet, A. L.; Sly, W. S.; Valle, D. (eds.): *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. Vol. 2 New York: McGraw-Hill (8<sup>th</sup> ed.), 2001; 2155-2157.

Tafani M, Minchenko DA, Serroni A, Farber JL. Induction of the mitochondrial permeability transition mediates the killing of HeLa cells by staurosporine. *Cancer Res* 2001; 61: 2459-66.

Tonkonogi M, Sahlin K. Rate of oxidative phosphorylation in isolated mitochondria from human skeletal muscle: effect of training status. *Acta Physiol Scand* 1997; 161: 345-53.

Toyoshima S, Watanabe F, Saido H, Miyatake K, Nakano Y. Methylmalonic acid inhibits respiration in rat liver mitochondria. *J Nutr* 1995; 125: 2846-50.

Treacy E, Arbour L, Chessex P, Graham G, Kasprzak L, Casey K et al. Glutathione deficiency as a complication of methylmalonic acidemia: response to high doses of ascorbate. *J Pediatr* 1996; 129: 445-8.

Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 2003; 552: 335-44.

Twomey EL, Naughten ER, Donoghue VB, Ryan S. Neuroimaging findings in glutaric aciduria type 1. *Pediatr Radiol* 2003; 33: 823-30.

Vercesi A, Reynafarje B, Lehninger AL. Stoichiometry of  $H^+$  ejection and  $Ca^{2+}$  uptake coupled to electron transport in rat heart mitochondria. J Biol Chem 1978; 253: 6379-85.

Vercesi AE, Kowaltowski AJ, Grijalba MT, Meinicke AR, Castilho RF. The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. Biosci Rep 1997; 17: 43-52.

Vercesi AE, Kowaltowski AJ, Oliveira HC, Castilho RF. Mitochondrial  $Ca^{2+}$  transport, permeability transition and oxidative stress in cell death: implications in cardiotoxicity, neurodegeneration and dyslipidemias. Front Biosci 2006; 11: 2554-64.

Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE et al. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. Cell 2000; 102: 43-53.

Wang GJ, Thayer SA. Sequestration of glutamate-induced  $Ca^{2+}$  loads by mitochondria in cultured rat hippocampal neurons. J Neurophysiol 1996; 76: 1611-21.

Wajner M, Coelho JC. Neurological dysfunction in methylmalonic acidemia is probably related to the inhibitory effect of methylmalonate on brain energy production. J Inher Metab Dis 1997; 20: 761-8.

Wajner M, Dutra JC, Cardoso SE, Wannmacher CMD, Motta ER. Effect of methylmalonate on in vitro lactate release and carbon dioxide production by brain of suckling rats. J Inher Metab Dis 1992; 15: 92-6.

Wajner M, Raymond K, Barschak A, Luft AP, Ferreira G, Domingues G et al. Detection of organic acidemias in Brazil. Arch Med Res 2002; 33: 581-5.

Worthen HG, al Ashwal A, Ozand PT, Garawi S, Rahbeeni Z, al Odaib A, Subramanyam SB, Rashed M. Comparative frequency and severity of hypoglycemia in selected organic acidemias, branched chain amino acidemia, and disorders of fructose metabolism. Brain Dev 1994; 16 Suppl: 81-5.

Yu AC, Drejer J, Hertz L, Schousboe A. Pyruvate carboxylase activity in primary cultures of astrocytes and neurons. J Neurochem 1983; 41: 1484-7.

Zecca L, Youdim MB, Riederer P, Connor JR, Crichton RR. Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. Nat Rev Neurosci 2004; 5: 863-73.

Zoratti M e Szabo I. The mitochondrial permeability transition. Biochim Biophys Acta 1995; 1241: 139-76.

Zoratti M, Szabò I, De Marchi U. Mitochondrial permeability transitions: how many doors to the house? Biochim Biophys Acta 2005; 1706: 40-52.

Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. J Biol Chem 1999; 274: 11549-56.

## 8. *Anexos*



**Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEIA-IB-UNICAMP**

**C E R T I F I C A D O**

Certificamos que o Protocolo nº 697-1, sobre "ALTERAÇÕES DO METABOLISMO ENERGÉTICO MITOCONDRIAL ASSOCIADA À FISIOPATOLOGIA DA ACIDEMIA METILMALÔNICA" sob a responsabilidade de Prof. Dr. Roger Frigério Castilho/Sandra Regina Mirandola está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEIA)-IB-UNICAMP em reunião de 01 de Julho de 2004.

**C E R T I F I C A T E**

We certify that the protocol nº 697-1, entitled "ALTERATIONS OF THE MITOCHONDRIAL ENERGY METABOLISM ASSOCIATED TO PHYSIOPATOLOGY OF THE METHYLMALONIC ACIDEMIA", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on July 1st, 2004.

Campinas, 1º. e Julho de 2004.

Prof. Dra. Liana Verinaud  
Presidente

Fátima Alonso  
Secretária

## Methylmalonate inhibits succinate-supported oxygen consumption by interfering with mitochondrial succinate uptake

S. R. Mirandola · D. R. Melo · P. F. Schuck ·  
G. C. Ferreira · M. Wajner · R. F. Castilho

Received: 25 October 2007 / Submitted in revised form: 2 December 2007 / Accepted: 4 December 2007 /  
Published online: 24 January 2008  
© SSIEM and Springer 2008

**Summary** The effect of methylmalonate (MMA) on mitochondrial succinate oxidation has received great attention since it could present an important role in energy metabolism impairment in methylmalonic acidemia. In the present work, we show that while millimolar concentrations of MMA inhibit succinate-supported oxygen consumption by isolated rat brain or muscle mitochondria, there is no effect when either a pool of NADH-linked substrates or *N,N,N',N'*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine (TMPD)/ascorbate were used as electron donors. Interestingly, the inhibitory effect of MMA, but not of malonate, on succinate-supported brain mitochondrial oxygen consumption was minimized when nonselective permeabilization of mitochondrial membranes was induced by alamethicin. In addition, only a slight inhibitory effect of MMA was observed on succinate-supported oxygen consumption by inside-out submitochondrial particles. In agreement with these

observations, brain mitochondrial swelling experiments indicate that MMA is an important inhibitor of succinate transport by the dicarboxylate carrier. Under our experimental conditions, there was no evidence of malonate production in MMA-treated mitochondria. We conclude that MMA inhibits succinate-supported mitochondrial oxygen consumption by interfering with the uptake of this substrate. Although succinate generated outside the mitochondria is probably not a significant contributor to mitochondrial energy generation, the physiopathological implications of MMA-induced inhibition of substrate transport by the mitochondrial dicarboxylate carrier are discussed.

### Abbreviations

BSA	bovine serum albumin
BiMA	butylmalonate
DCIP	2,6-dichlorophenolindophenol
MA	malonate
2-MCA	2-methylcitrate
MCM	methylmalonyl-CoA mutase
MMA	methylmalonate
PMS	phenazine methosulfate
SDH	succinate dehydrogenase
TMPD	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethyl- <i>p</i> -phenylenediamine

### Introduction

Methylmalonic acidemias consist of a group of autosomal recessive genetic disorders affecting the catabolic pathway of the amino acids isoleucine, valine, methionine and threonine, as well as of odd-chain fatty acids and the side-chain of cholesterol. Methylmalonic acidemias are caused by complete (mut<sup>0</sup>) or partial (mut<sup>-</sup>) deficiency of methylmalonyl-

Communicating editor: Garry Brown

Competing interests: None declared

References to electronic databases: Methylmalonyl-CoA mutase: EC 5.4.99.2).

S.R. Mirandola and D.R. Melo contributed equally to this work. Drs. M. Wajner and R.F. Castilho share senior authorship.

S. R. Mirandola · D. R. Melo · R. F. Castilho (✉)  
Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências  
Médicas, Universidade Estadual de Campinas,  
Campinas, SP 13083-887, Brazil  
e-mail: roger@fcm.unicamp.br

P. F. Schuck · G. C. Ferreira · M. Wajner  
Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas  
da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,  
Porto Alegre RS, Brazil



CoA mutase (MCM; EC 5.4.99.2) or by defects in the genes encoding the synthesis, activation or transport of adenosylcobalamin, which is the cofactor of MCM. MCM deficiency leads to the primary accumulation of methylmalonate (MMA) from L-methylmalonyl-CoA, and to the secondary accumulation of other metabolites such as propionate, 3-hydroxypropionate and 2-methylcitrate (2-MCA) (Fenton et al 2001). Levels of MMA in the blood and cerebrospinal fluid have been determined as being as high as 2.9 mmol/L during crises (Fenton et al 2001), and may be even higher in the brain because dicarboxylic acids tend to be trapped inside neural cells (Hoffmann et al 1993; Sauer et al 2006).

The clinical phenotype of affected individuals includes failure to thrive, developmental delay with subsequent mental retardation, acute metabolic decompensation with ketoacidosis, vomiting, lethargy, coma and seizures, and, in the most severe cases, infant death. Cerebral imaging has revealed a symmetric degeneration of the basal ganglia, particularly the globus pallidus (Brismar and Ozand 1994; Larnaout et al 1998). Although the physiopathological mechanisms underlying the neurological signs in this disorder are not well established, these pathological changes may be caused by the accumulation of toxic organic acids (Heidenreich et al 1988).

Furthermore, during acute encephalopathic crises, patients with methylmalonic acidemias present enhanced amounts of lactic acid in the globus pallidus, suggesting inhibition of mitochondrial energy metabolism *in vivo* (Trinh et al 2001). There is a great deal of evidence suggesting that MMA compromises mitochondrial function, since it competes with malate transport (Halperin et al 1971), increases lactate production *ex vivo* and *in vitro* (Royes et al 2003; Saad et al 2006; Wajner and Coelho 1997; Wajner et al 1992) and decreases ATP levels (McLaughlin et al 1998), CO<sub>2</sub> production (Wajner et al 1992) and succinate-supported O<sub>2</sub> consumption (Kowaltowski et al 2006; Maciel et al 2004; Toyoshima et al 1995). It has also been proposed that MMA is a weak competitive inhibitor of succinate dehydrogenase (SDH) in rat brain and liver, an effect that has been attributed to the structural similarity between MMA, malonate (MA), the classical SDH inhibitor, and succinate, the substrate of SDH (Brusque et al 2002; Dutra et al 1993; Fleck et al 2004; Marisco et al 2003; Pettenuzzo et al 2006; Toyoshima et al 1995). However, the inhibitory effect of MMA on SDH activity has not been detected in purified submitochondrial particles from bovine heart (Kolker et al 2003; Okun et al 2002) and when high concentrations of succinate

were used in the medium to measure this enzymatic activity (Brusque et al 2002; Pettenuzzo et al 2006). It has been also argued that MMA is not the major neurotoxin in methylmalonic acidemias and part of the effects obtained with MMA were considered to be artefactual or a result of intracellular formation of MA and 2-MCA from MMA (Kolker and Okun 2005; Kolker et al 2003; Okun et al 2002). However, cleavage of the methyl group of MMA by esterases is unlikely to explain MA formation (Okun et al 2002), as is the reversibility of the propionyl-CoA pathway to form 2-MCA (Reszko et al 2003). Thus, at this stage there is an intense debate on whether MMA impairs mitochondrial bioenergetics and more particularly SDH/respiratory chain complex II activity.

Therefore, the major purpose of the present study was to investigate the *in vitro* effects of MMA on succinate-supported oxygen consumption by isolated rat brain and muscle mitochondria in order to clarify this issue. The most interesting findings observed were that MMA is an important inhibitor of succinate transport through mitochondrial membranes.

## Material and methods

### Materials

Most chemicals, including ADP, alamethicin, ascorbic acid, butylmalonic acid, glutaric acid, malonic acid, methylmalonic acid, succinic acid and *N,N,N',N'*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine (TMPD) were obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). ADP, ascorbate, glutamate,  $\alpha$ -ketoglutarate, malate, pyruvate, succinate, butylmalonate (BtMA), MA and MMA solutions were prepared by dissolving the respective acids in water and adjusting the pH to 7.2 with KOH.

### Animals

Nine-week-old female Wistar rats (*Rattus norvegicus albinos*) were obtained from the UNICAMP Central Animal Breeding Center. The animals were kept under standard laboratory conditions (20–22°C and 12 h/12 h light/dark cycle) with free access to a standard diet (Labina/Purina, Campinas, SP, Brazil) and tap water. Animal experiments followed University guidelines for the use of animals in experimental studies and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institute of Health (NIH publication no. 85-23, revised in 1996).



#### Isolation of rat forebrain mitochondria

Forebrain mitochondria were isolated as described by Rosenthal and colleagues (1987), with minor modifications, from female Wistar rats weighing 200–240 g. Rats were killed by decapitation and their brains were rapidly removed (within 1 min) and put into 10 ml of ice-cold 'isolation buffer' containing 225 mmol/L mannitol, 75 mmol/L sucrose, 1 mmol/L  $K^+$ -EGTA, 0.1% bovine serum albumin (BSA; fatty acid-free) and 10 mmol/L  $K^+$ -Hepes, pH 7.2. The cerebellum and underlying structures were removed and the remaining material was used as the forebrain. The tissue was cut into small pieces using surgical scissors and extensively washed. The tissue was then manually homogenized in a Dounce homogenizer using 6 strokes with a loose-fitting glass pestle followed by 7–8 strokes with a tight-fitting pestle. The homogenate was centrifuged for 3 min at 2000 g in a Beckman JA-25.50 rotor (Beckman, Palo Alto, CA, USA). After centrifugation, the supernatant was recentrifuged for 8 min at 12 000g. The pellet was resuspended in 20 ml 'isolation buffer' containing 40  $\mu$ l of 10% digitonin and recentrifuged for 10 min at 12 000g. The supernatant and the light layer of the pellet were discarded and the dark pellet was resuspended in 'isolation buffer' devoid of EGTA. This was then centrifuged for 10 min at 12 000g. The supernatant was discarded and the final pellet was gently washed and resuspended in 'isolation buffer' devoid of EGTA, at an approximate protein concentration of 30–40 mg/ml. The respiratory control ratio (state 3/state 4 respiratory rate) was over 5.0, measured using 5 mmol/L glutamate plus 5 mmol/L malate as substrates.

#### Isolation of rat muscle and liver mitochondria

Rat muscle and liver mitochondria were isolated as described previously (Velho et al 2006). The final pellets from muscle and liver mitochondrial preparations were resuspended in 250 mmol/L sucrose and 10 mmol/L  $K^+$ -Hepes pH 7.2 to final protein concentrations of approximately 50 and 80 mg/ml, respectively.

#### Preparation of inside-out submitochondrial particles from rat liver

A fraction enriched in inside-out submitochondrial particles was obtained from isolated rat liver mitochondria as described by Harmon (1982) with minor modifications. Frozen aliquots (4–5 ml) of rat liver

mitochondria were thawed, homogenized, and resuspended in 0.25 mol/L sucrose and 10 mmol/L  $K^+$ -Hepes pH 7.4 to a volume of 10 ml. Following centrifugation at 27 000 g for 15 min, the mitochondrial pellet was resuspended at protein concentration of approximately 30 mg/ml in 0.25 mol/L sucrose, 10 mmol/L  $K^+$ -Hepes and 10 mmol/L sodium phosphate, pH 7.4. This mitochondrial suspension was sonicated three times for 30 s each with intervals of 1 min in an ice bath, using a 3 mm titanium microtip in an ultrasonic processor (50 W, 20 kHz) at 30% of the maximal output. The sonicated mixture was centrifuged at 23 500g for 10 min. The pellet was discarded and the supernatant was centrifuged at 44 000g for 30 min. The supernatant was discarded, and the pellet was resuspended in 0.25 mol/L sucrose, 10 mmol/L  $K^+$ -Hepes pH 7.4 and 0.15 mol/L KCl medium and centrifuged again twice under the same conditions. The resultant pellet was resuspended in 0.25 mol/L sucrose and 10 mmol/L  $K^+$ -Hepes pH 7.4 and centrifuged at 15 000g for 10 min. The pellet was discarded and the supernatant was centrifuged again at 44 000 g for 30 min. The final pellet was resuspended in 0.25 mol/L sucrose and 20 mmol/L  $K^+$ -Hepes pH 7.4 and stored in an ice bath until used. This preparation procedure for obtaining submitochondrial particles resulted in more than 85% of inverted (inside-out) vesicles as evaluated by the effect of exogenous cytochrome *c* (5  $\mu$ mol/L) on NADH-supported oxygen consumption (Harmon 1982).

#### Protein determination

The protein content of mitochondrial and submitochondrial particle suspensions was determined by the Biuret assay (Gornall et al 1949) in the presence of 0.2% deoxycholate, using bovine serum albumin as a standard.

#### Oxygen uptake measurements

Oxygen consumption was measured using a Clark-type electrode (Hansatech Instruments Limited, Norfolk, UK) in a 1.0 ml sealed glass cuvette equipped with a magnetic stirrer and kept at 37°C. The experiments measuring oxygen consumption by isolated mitochondria and submitochondrial particles were carried out in a standard reaction medium containing 130 mmol/L KCl, 10 mmol/L  $K^+$ -Hepes pH 7.2, 2 mmol/L  $KH_2PO_4$ , 1 mmol/L  $MgCl_2$ , 200  $\mu$ mol/L EGTA and 800  $\mu$ mol/L ADP. ADP was present to stimulate respiration by oxidative phosphorylation. Other additions are indi-

cated in the figure legends. Under control conditions, brain mitochondrial oxygen consumption rates (nmol O<sub>2</sub>/min per mg protein) were 56.9±4.3 using glutamate, malate, α-ketoglutarate and pyruvate (1.25 mmol/L each), 70.3±4.0 using 5 mmol/L succinate plus 2 μmol/L rotenone, or 51.3±3.2 using 200 μmol/L TMPD–1 mmol/L ascorbate plus 1 μmol/L antimycin A. Using TMPD–ascorbate, we noticed that respiratory rates in our brain mitochondrial preparations were lower than those seen with succinate. This is probably due to limited accessibility of cytochrome *c* to electrons donated by TMPD.

#### Assay of mitochondrial succinate transport

Succinate transport was estimated in a suspension of isolated brain mitochondria using a model F-4010 Hitachi spectrofluorometer (Hitachi Ltd, Tokyo, Japan) operating at excitation and emission wavelengths of 540 nm, with slit widths of 3.0 nm. This methodology is based on the decrease in mitochondrial light scattering due to swelling that accompanies net salt transport into the organelles (Liu et al 1996). Rat brain mitochondria (0.4 mg/ml) were incubated in medium containing 0.1 mmol/L K<sup>+</sup>-EGTA, 0.1 mmol/L K<sup>+</sup>-EDTA, 5 mmol/L K<sup>+</sup>-MOPS (pH 7.0), 0.2 μmol/L antimycin A, 0.7 μmol/L nigericin and 36.7 mmol/L K<sup>+</sup> salts of succinate, glutarate and/or MMA, at 37°C. All media were prepared to approximately 110 mOsm. Under these experimental conditions, stimulation of mitochondrial swelling by 2 mmol/L P<sub>i</sub> (potassium salt, pH 7.0) reflects activity of the dicarboxylate carrier (Liu et al 1996). Mitochondrial swelling rates between 5 and 35 seconds after P<sub>i</sub> addition were used to quantify the measurements.

#### Succinate dehydrogenase (SDH) activity

The assay was based on the reduction of phenazine methosulfate (PMS) by SDH (Singer 1974). Reduced PMS is immediately reoxidized by 2,6-dichlorophenolindophenol (DCIP), and bleaching of the latter dye was followed spectrophotometrically at 600 nm. Mitochondria (0.2 mg/ml) were incubated in a 2 ml glass spectrophotometer cuvette at 37°C in medium containing 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4), 1 mmol/L succinate, 1 μmol/L antimycin A, 1 mmol/L KCN, 1% Triton X-100, 1 mmol/L PMS and 80 μmol/L DCIP. In Fig. 6, these reagents were added to the reaction media after a 10 min pre-incubation period, resulting in a two-fold dilution of the original mitochondrial suspension. Where indicated, the assays were conducted in the presence of MMA, MA or

BtMA. The decrease in absorbance at 600 nm was recorded during 5 min.

#### Malonate (MA) and 2-methylcitrate (2-MCA) determination

Mitochondrial preparations from rat forebrain (0.5 mg/ml) were incubated for 10 min at 37°C in reaction medium containing 130 mmol/L KCl, 10 mmol/L K<sup>+</sup>-Hepes pH 7.2, 2 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 200 μmol/L EGTA and 2 mmol/L succinate in the absence or presence of 10 mmol/L MMA in a total volume of 2 ml. MA and 2-MCA were determined in the mitochondrial suspension by capillary gas chromatography–mass spectrometry, as previously described (Wajner et al 2002). MA and 2-MCA were used for external calibration. Correlation coefficients of standard curves were >0.92.

#### Statistical analysis

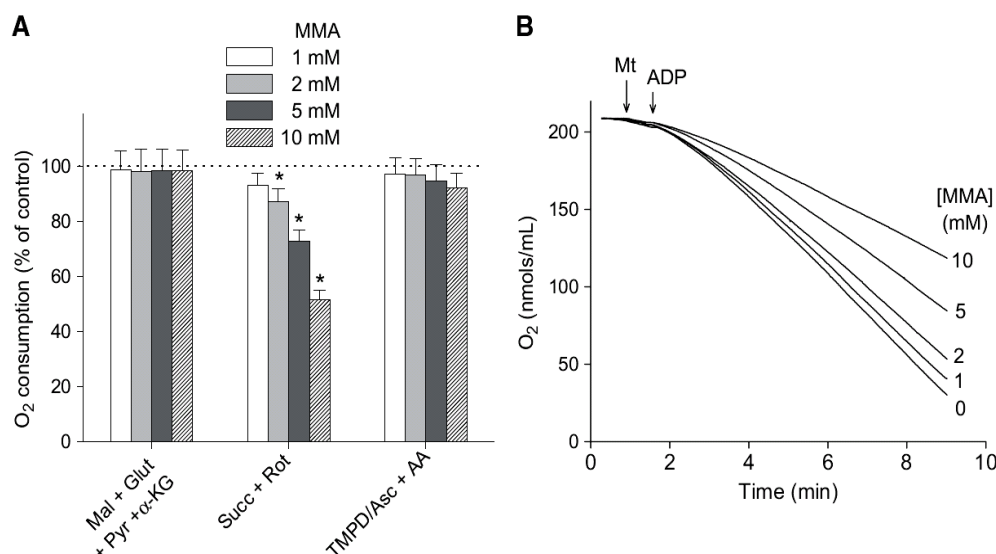
Data from the experiments were analysed by one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. When one parameter was compared between two groups, Student's *t*-test was used. Data are presented as averages±standard error of the mean (±SEM) of at least four experiments conducted with different preparations.

## Results

#### MMA inhibits succinate-supported mitochondrial oxygen consumption

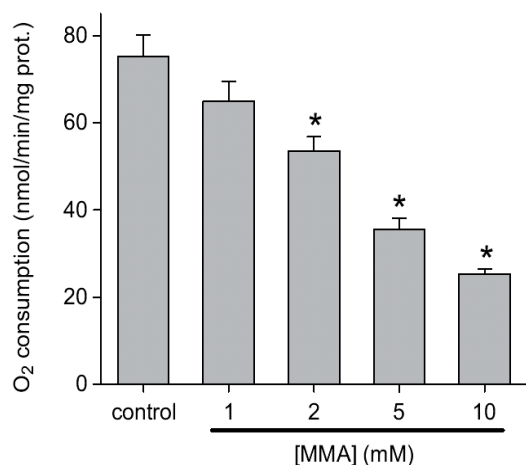
The effect of MMA on brain mitochondrial oxygen consumption was studied at concentrations varying from 1 to 10 mmol/L (Fig. 1). MMA significantly inhibited succinate-supported mitochondrial oxygen consumption in a dose-dependent manner. In addition, the results displayed in Fig. 1A show no inhibitory effect of MMA on mitochondrial respiration when either a pool of NADH-linked substrates or TMPD/ascorbate were used as electron donors. A pool of respiratory chain complex I substrates was used to avoid the effect of MMA on the transport of single substrates through the inner mitochondrial membrane, either stimulating or inhibiting their transport (Halperin et al 1971). Representative traces in Fig. 1B show that the degree of inhibition of succinate-supported mitochondrial oxygen consumption by MMA was constant during the time course of the experiments.

Since Kolker and colleagues (2003) did not observe a significant inhibitory effect of MMA (1 mmol/L)



**Fig. 1** Effect of MMA on brain mitochondrial oxygen consumption. Isolated rat forebrain mitochondria (Mt; 0.5 mg/ml) were incubated at 37°C in standard reaction medium containing either a pool of NADH-linked substrates (malate, glutamate, pyruvate and α-ketoglutarate (Mal+Glut+Pyr+α-KG); 1.25 mmol/L each), 5 mmol/L succinate plus 2 μmol/L rotenone (Succ+Rot), or 200 μmol/L TMPD–1 mmol/L ascorbate plus 1 μmol/L antimycin A (TMPD/Asc+AA). Rotenone and antimycin A were used to ensure respiratory chain complex I and III inhibition, respectively.

(A) Mitochondrial oxygen consumption in the presence of different respiratory chain substrates and varying concentrations of MMA (1–10 mmol/L), as indicated in the figure. Data are shown as percentage of the respective control rates. (B) Representative traces of succinate-supported mitochondrial oxygen consumption in the presence of varying concentrations of MMA (1–10 mmol/L). Data in (A) represent the mean±SEM of at least 5 independent experiments performed in duplicate. \*Significantly different from the respective control at  $p < 0.01$



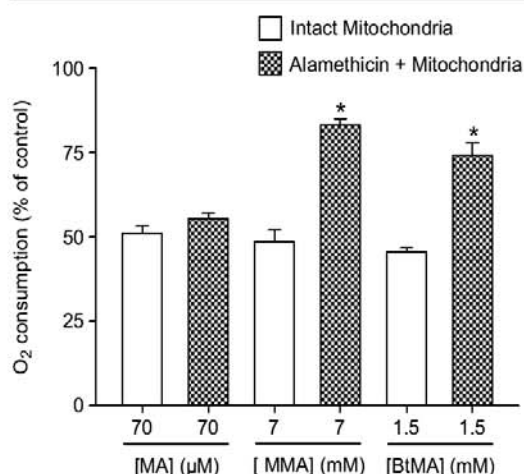
**Fig. 2** Effect of MMA on succinate-supported muscle mitochondrial oxygen consumption. Isolated muscle mitochondria (0.5 mg/ml) were incubated at 37°C in standard reaction medium containing 1 mmol/L succinate and 2 μmol/L rotenone. Mitochondrial oxygen consumption measurements were done in the presence of varying concentrations of MMA (1–10 mmol/L), as indicated in the figure. Data represent the mean±SEM of at least 5 independent experiments performed in duplicate. \*Significantly different from control at  $p < 0.01$

on succinate-supported oxygen consumption using a crude mouse muscle mitochondrial preparation, we decided to test the effect of MMA (1–10 mmol/L) on isolated rat muscle mitochondria under our experimental conditions. In fact, when tested at 1 mmol/L, MMA promoted only a trend for inhibition of oxygen consumption by muscle mitochondria (Fig. 2). However, when MMA was present at higher concentrations (2–10 mmol/L), a significant and dose-dependent inhibition of mitochondrial respiration was observed. These results indicate that the inhibitory effect of MMA on succinate-supported mitochondrial respiration is not restricted to brain (Fig. 1; Kowaltowski et al 2006; Maciel et al 2004) and liver (Toyoshima et al 1995).

Substrate transport inhibition causes the MMA effect on succinate-supported mitochondrial oxygen consumption

Recent publications from Kolker's group (Kolker et al 2003; Okun et al 2002) show that MMA, at millimolar concentrations, does not inhibit SDH activity in bovine





**Fig. 3** Effect of MA, MMA and BtMA on oxygen consumption by intact or alamethicin-permeabilized mitochondria. Isolated rat forebrain mitochondria (0.5 mg/ml) were incubated at 37°C in standard reaction medium containing 2 mmol/L succinate, 2  $\mu$ mol/L rotenone and 5  $\mu$ mol/L cytochrome *c*. Mitochondrial oxygen consumption measurements were done in the presence of 70  $\mu$ mol/L MA, 7 mmol/L MMA or 1.5 mmol/L BtMA. Alamethicin (40  $\mu$ g/mg protein) was present where indicated. Data represent the mean  $\pm$  SEM of at least 5 independent experiments performed in duplicate. \*Significantly different from intact mitochondria at  $p < 0.01$

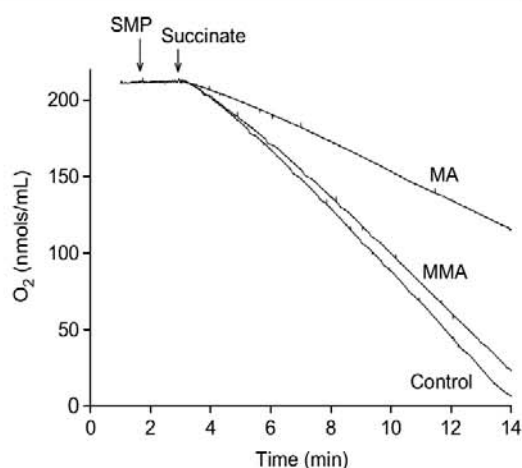
heart submitochondrial particles. On the other hand, MA potently inhibits this enzyme at micromolar concentrations. One possibility to reconcile these findings with our previous results (Kowaltowski et al 2006; Maciel et al 2004) and the present findings is an inhibitory effect of MMA on mitochondrial succinate transport. In fact, an early report by Halperin and colleagues (1971) reported that MMA is an important inhibitor of malate transport by the mitochondrial

**Table 1** Effects of malonate, methylmalonate and butylmalonate on SDH activity

Conditions	SDH activity (% of control)
Malonate	53.1 $\pm$ 3.4*
Methylmalonate	94.5 $\pm$ 6.0
Butylmalonate	93.0 $\pm$ 6.8

Activity of brain mitochondrial SDH was determined as described in Material and methods under control conditions or in the presence of 70  $\mu$ mol/L malonate, 7 mmol/L methylmalonate or 1.5 mmol/L butylmalonate. Under control conditions, SDH activity was 81.9  $\pm$  5.5 nmol of reduced DCIP per min per mg protein. Values represent the mean  $\pm$  SEM of 4 independent experiments performed in duplicate.

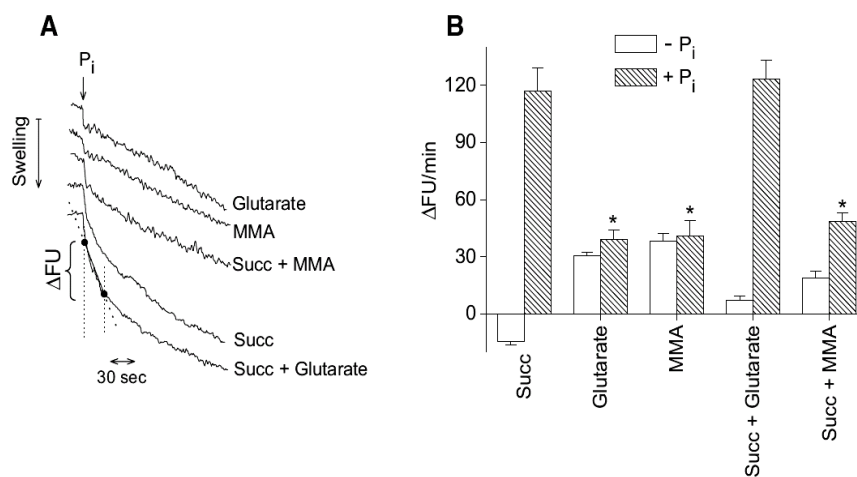
\*Significantly different from control at  $p < 0.01$ .



**Fig. 4** Effects of MA and MMA on submitochondrial particle oxygen consumption. Rat liver submitochondrial particles (SMP, 0.1 mg/ml) were incubated at 37°C in standard reaction medium containing 1 mmol/L succinate under control conditions or in the presence of either 70  $\mu$ mol/L MA or 7 mmol/L MMA. Traces are representative of 4 independent experiments performed in duplicate

dicarboxylate carrier. To assess this hypothesis, we monitored the effect of MMA on succinate-supported mitochondrial oxygen consumption under situations in which the transport of this substrate is not required. We first used brain mitochondria nonselectively permeabilized by the pore-forming compound alamethicin (He et al 1996). MA, MMA or BtMA, an inhibitor of mitochondrial dicarboxylate transport (Robinson and Chappell 1967), were used at concentrations necessary to ensure approximately 50% inhibition of succinate-supported oxygen consumption by intact organelles (Fig. 3, open bars). When the same concentrations of MA, MMA and BtMA were used in the presence of alamethicin, MA still exhibited a similar inhibition of succinate-supported oxygen consumption, but MMA and BtMA lost most of their inhibitory effect (Fig. 3, chequered bars). SDH activity was determined under similar experimental conditions using Triton X-100-permeabilized brain mitochondria. We observed that, while MA inhibits approximately 50% of enzyme activity, no significant inhibitory effect was promoted either by MMA or BtMA (Table 1).

A second experimental protocol to study succinate-supported mitochondrial respiration independent of substrate transport was designed, using a preparation enriched in inside-out submitochondrial particles (Harmon 1982) (Fig. 4). Under these conditions, only a slight inhibitory effect was obtained



**Fig. 5** Inhibitory effect of MMA on mitochondrial succinate transport by the dicarboxylate carrier. Rat forebrain mitochondria (0.4 mg/ml) were incubated at 37°C in reaction medium containing 0.1 mmol/L  $K^+$ -EGTA, 0.1 mmol/L  $K^+$ -EDTA, 5 mmol/L  $K^+$ -MOPS pH 7.0, 0.2  $\mu$ mol/L antimycin A and 0.7  $\mu$ mol/L nigericin. The medium contained a total of 36.7 mmol/L of potassium salts of succinate (Succ), glutarate and/or MMA: when two different salts were present, they were

added at equal concentrations (18.35 mmol/L). **(A)** Representative figure of mitochondrial swelling in the presence of different dicarboxylates. Where indicated by the arrow, 2 mmol/L  $P_i$  (potassium salt) was added to the reaction medium. **(B)** Rates of mitochondrial swelling in the absence or presence of 2 mmol/L  $P_i$  (potassium salt). Data represent the mean  $\pm$  SEM of at least 5 independent experiments performed in duplicate. FU, fluorescence units. \*Significantly different from 'Succ +  $P_i$ ' at  $p < 0.01$

with MMA at millimolar concentrations, while MA, at micromolar concentrations, induced a potent inhibition of succinate-supported submitochondrial particle oxygen consumption.

#### Mitochondrial dicarboxylate carrier inhibition by MMA

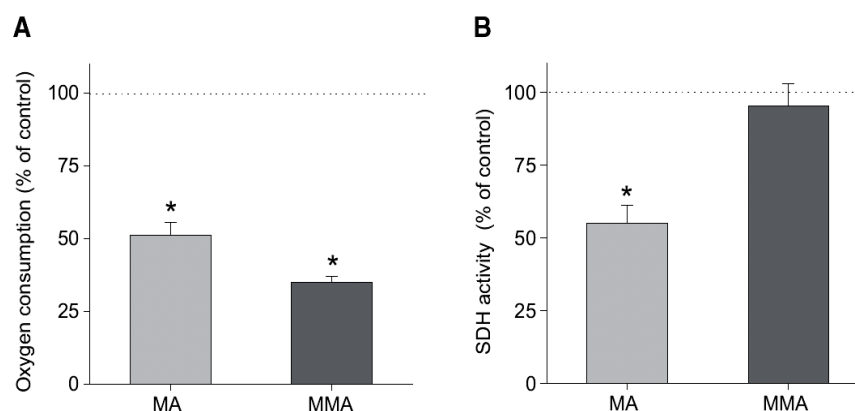
In order to study the inhibitory effect of MMA on succinate transport by the dicarboxylate carrier, mitochondrial swelling experiments were conducted in a hyposmotic medium containing potassium salts, the respiratory chain inhibitor antimycin A and the  $K^+/H^+$  ionophore nigericin. Under these conditions, the addition of  $P_i$  promotes transport of dicarboxylates into the mitochondrial matrix and consequent organellar swelling (Liu et al 1996). Figure 5 shows the initial rates of mitochondrial swelling in the absence and presence of  $P_i$  in reaction media containing  $K^+$  salts of succinate, glutarate and/or MMA. Glutarate was used as a control anion that is not transported by the dicarboxylate carrier (Liu et al 1996). As expected, extensive mitochondrial swelling was promoted by addition of  $P_i$  to brain mitochondria incubated in succinate. This swelling was not inhibited when medium was prepared containing equal quantities of succinate and glutarate as osmotic support. Nevertheless, when

succinate and MMA were used, an almost complete inhibition of  $P_i$ -induced swelling was observed.

#### MA production and SDH activity in MMA-treated mitochondria

A potential explanation for the result obtained would be that MMA generates MA in the mitochondrial matrix, which then inhibits SDH. To investigate this possibility, MA and 2-MCA were measured in brain mitochondrial suspensions after incubation with 10 mmol/L MMA during 10 min. Analyses performed by gas chromatography-mass spectrometry revealed no traces of these organic acids (results not shown; sensitivity of the assay  $\sim 1$  nmol/mg protein).

The experiment reported in Fig. 6 was conducted to further verify whether isolated mitochondria incubated with MMA generated functionally significant quantities of MA. For these experiments, liver mitochondria were chosen because they resulted in more stable and reproducible results of SDH activity than isolated brain organelles under these conditions (results not shown). In intact liver mitochondria, we found that either 70  $\mu$ mol/L MA or 7 mmol/L MMA lead to a decrease in oxygen consumption of approximately 50% (Fig. 6A). Samples of intact mitochondria incubated under these conditions for 10 min were collected



**Fig. 6** Effects of pre-incubation with MMA and MA on liver mitochondrial SDH activity. **(A)** Oxygen consumption by rat liver mitochondria (0.4 mg/ml) during a 10 min incubation in standard reaction medium containing 1 mmol/L succinate and 2  $\mu$ mol/L rotenone in the presence of 70  $\mu$ mol/L MA or 7 mmol/L MMA. Data are represented as percentages of oxygen consumption in the absence of MA or MMA. **(B)** SDH activity after a 10 min pre-incubation under conditions indicated in the abscissa. After the

pre-incubation period, 1% Triton X-100 and reagents for determination of SDH activity were added to the mitochondrial suspension (see **Materials and methods**). Under control conditions, SDH activity was  $90.6 \pm 5.9$  nmol of reduced DCIP/min per mg protein. Data represent the mean  $\pm$  SEM of 4 independent experiments performed in duplicate. \*Significantly different from control at  $p < 0.01$

and treated with the detergent Triton X-100 in order to permeabilize mitochondria and release any MMA-generated metabolites accumulated in the matrix. SDH activity was then assayed as described in **Material and methods**. Samples pre-incubated in the presence of MA showed an important inhibition of SDH activity, indicating that MA-induced SDH inhibition could be readily detected under these conditions (Fig. 6B). The minimal concentration of MA present during the pre-incubation period that resulted in a significant inhibitory effect in the subsequent SDH assay was 10  $\mu$ mol/L (result not shown), supporting the idea that this assay is a sensitive method for evaluating the presence of MA in the suspension. On the other hand, samples pre-incubated with 7 mmol/L MMA did not show any inhibitory effect on SDH after mitochondrial permeabilization with detergent. This result clearly indicates that no functionally significant amounts of MA accumulate in mitochondrial suspensions treated with MMA.

## Discussion

In the present work we studied the inhibitory effect of MMA on mitochondrial succinate oxidation. In intact isolated brain and muscle mitochondria, millimolar MMA inhibited oxygen consumption maintained by succinate (Figs. 1 and 2). This observation is in accordance with previous studies reporting an inhibitory

effect of MMA on succinate-supported oxygen consumption in isolated liver (Toyoshima et al 1995) and brain (Kowaltowski et al 2006; Maciel et al 2004) mitochondria. In addition, we showed that the inhibitory effect of MMA on mitochondrial oxygen consumption was not observed when electron donors to respiratory chain complexes I or IV were used. Under our experimental conditions, an immediate and uniform inhibition pattern of succinate-supported oxygen consumption was obtained, suggesting a direct effect of MMA on succinate-supported mitochondrial respiration and not a progressive interaction of this compound with mitochondrial components or formation of reactive products. In fact, we did not observe significant MA production in brain and liver mitochondria incubated in the presence of MMA. Okun and colleagues (2002) reported formation of MA in cultured striatal neurons treated with MMA (10 mmol/L), but MA was detected only in nanomolar concentrations and after 2 h of incubation.

In contrast to the results obtained with MMA-treated intact mitochondria oxidizing succinate, only a small effect of MMA was observed on succinate-supported oxygen consumption in permeabilized mitochondria (Fig. 3) or inverted submitochondrial particles (Fig. 4). In addition, no inhibitory effect of MMA was observed on SDH activity from detergent-permeabilized mitochondria (Table 1). In agreement with this last observation, Kolker's group also did not observe any important effects of MMA on SDH activity in submitochondrial particles (Kolker



et al 2003; Okun et al 2002), and recent publications from Wajner's group reported only a marginal inhibition of SDH activity by MMA in brain homogenates (Brusque et al 2002; Pettenuzzo et al 2006). These results suggest that the inhibitory effect of MMA on mitochondrial succinate oxidation is most likely due to inhibition of mitochondrial transport of this substrate. We showed evidence that succinate is transported by the dicarboxylate carrier in brain mitochondria (Fig. 5), as is the case for liver and kidney organelles (Palmieri et al 1971; Rumbach et al 1989; Schoolwerth and LaNoue 1985). In addition, our results identified MMA as a potent inhibitor of mitochondrial succinate transport by the dicarboxylate carrier (Fig. 5). This MMA effect explains the result of MMA on succinate-supported oxygen consumption observed in isolated brain (Kowaltowski et al 2006; Maciel et al 2004; present study) and liver (Toyoshima et al 1995) mitochondria. On the other hand, muscle mitochondria express very low amounts of the dicarboxylate carrier (Fiermonte et al 1999). Succinate transport into muscle mitochondria occurs most likely via the  $\alpha$ -ketoglutarate carrier (Palmieri et al 1972; Sluse et al 1971) or other transport systems such as the mitochondrial inner membrane anion channel (IMAC) (Liu et al 1996). The mechanism by which MMA inhibits succinate transport in muscle mitochondria is unknown, but probably also involves competition with succinate for uptake into mitochondria.

Although succinate generated outside mitochondria is probably not a significant contributor to oxidative phosphorylation, mitochondrial dicarboxylate carrier inhibition by MMA probably has important physiopathological implications, such as inhibition of gluconeogenesis in liver and kidney, impairment of neuronal energy metabolism, glutamatergic neurotransmission and induction of oxidative stress, as discussed below. The inhibition of the mitochondrial dicarboxylate carrier by MMA in liver and kidney probably impairs gluconeogenesis. In fact, Halperin and colleagues (1971) proposed that MMA inhibition of malate transport through the mitochondrial dicarboxylate carrier contributes to hypoglycaemia in methylmalonic acidemia. Malate is the main metabolic substrate transported by the dicarboxylate carrier (Schoolwerth and LaNoue 1985), while the transport of succinate or oxaloacetate by this carrier is either minor or less understood under physiological conditions. In the central nervous system, where gluconeogenesis does not occur, the physiological role of the mitochondrial dicarboxylate carrier is less understood, but is probably associated with supplying substrates to the tricarboxylic acid cycle, since intermediates of this cycle are expended during *de novo*

glutamate synthesis (Hertz 2004). Neurons are considered incapable of *de novo* synthesis of tricarboxylic acid cycle intermediates, which requires pyruvate carboxylation present only in astrocytes (Yu et al 1983). In this regard, neuronal energy metabolism and glutamatergic neurotransmission may be compromised when MMA reaches high concentrations in the central nervous system. In addition, as recently proposed by Morath and colleagues (2007), mitochondrial dicarboxylate carrier inhibition by MMA may also inhibits glutathione (GSH) transport into kidney mitochondria (Lash 2006), promoting oxidative stress and chronic renal failure. This may be true for the brain as well, since *in vitro* and *in vivo* studies have demonstrated that MMA elicits oxidative stress in cerebral tissue (Figuera et al 1999; Fontella et al 2000; Malfatti et al 2003), the most affected tissue in methylmalonic acidemia patients.

We conclude that results showing an inhibitory effect of MMA on either SDH activity (Brusque et al 2002; Dutra et al 1993; Fleck et al 2004; Pettenuzzo et al 2006) or succinate-supported mitochondrial oxygen consumption (Kowaltowski et al 2006; Maciel et al 2004; Toyoshima et al 1995) can be explained by an inhibitory effect of this organic acid on succinate transport through membranes and not by a direct effect on SDH activity (Kolker et al 2003; Okun et al 2002; present study).

**Acknowledgements** We thank Dr Alicia Kowaltowski for discussions, Edilene S. Santos and Elisangela J. Gomes for technical support and Dr. Luciane C. Alberici for help regarding rat muscle mitochondrial isolation. This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the National Institutes of Health (NIH) (grant number: 1 R03 HD047388–01A1). S.R.M and D.R.M. are graduate students supported by CNPq and FAPESP fellowships, respectively.

## References

- Brismar J, Ozand PT (1994) CT and MR of the brain in disorders of propionate and methylmalonate metabolism. *Am J Neuroradiol* **15**: 1459–1473.
- Brusque AM, Borba Rosa R, Schuck PF, et al (2002) Inhibition of the mitochondrial respiratory chain complex activities in rat cerebral cortex by methylmalonic acid. *Neurochem Int* **40**: 593–601.
- Dutra JC, Dutra-Filho CS, Cardozo SE, Wannmacher CM, Sarkis JJ, Wajner M (1993) Inhibition of succinate dehydrogenase and beta-hydroxybutyrate dehydrogenase activities by methylmalonate in brain and liver of developing rats. *J Inher Metab Dis* **16**: 147–153.
- Fenton WA, Gravel RAA, Rosenblatt DS (2001) Disorders of propionate and methylmalonate metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds; Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B, assoc. eds. *The Metabolic and Molecular*

- Bases of Inherited Disease*, 8th edn. New York: McGraw-Hill, 2165–2193.
- Fiermonte G, Dolce V, Arrigoni R, Runswick MJ, Walker JE, Palmieri F (1999) Organization and sequence of the gene for the human mitochondrial dicarboxylate carrier: evolution of the carrier family. *Biochem J* **344**: 953–960.
- Figuera MR, Queiroz CM, Stracke MP, et al (1999) Ascorbic acid and alpha-tocopherol attenuate methylmalonic acid-induced convulsions. *NeuroReport* **10**: 2039–2043.
- Fleck J, Ribeiro MC, Schneider CM, Sinhorin VD, Rubin MA, Mello CF (2004) Intrastriatal malonate administration induces convulsive behaviour in rats. *J Inherit Metab Dis* **27**: 211–219.
- Fontella FU, Pulrolnik V, Gassen E, et al (2000) Propionic and L-methylmalonic acids induce oxidative stress in brain of young rats. *NeuroReport* **11**: 541–544.
- Gornall AG, Bardawill CJ, Donid MM (1949) Determination of serum protein by means of the Biuret reaction. *J Biol Chem* **177**: 751–766.
- Halperin ML, Schiller CM, Fritz IB (1971) The inhibition by methylmalonic acid of malate transport by the dicarboxylate carrier in rat liver mitochondria. A possible explanation for hypoglycemia in methylmalonic aciduria. *J Clin Invest* **50**: 2276–2282.
- Harmon HJ (1982) Isolation of totally inverted submitochondrial particles by sonication of beef heart mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* **14**: 377–386.
- He K, Ludtke SJ, Worcester DL, Huang HW (1996) Neutron scattering in the plane of membranes: structure of alamethicin pores. *Biophys J* **70**: 2659–2666.
- Heidenreich R, Natowicz M, Hainline BE, et al (1988) Acute extrapyramidal syndrome in methylmalonic acidemia: “metabolic stroke” involving the globus pallidus. *J Pediatr* **113**: 1022–1027.
- Hertz L (2004) Intercellular metabolic compartmentation in the brain: past, present and future. *Neurochem Int* **45**: 285–296.
- Hoffmann GF, Meier-Augenstein W, Stocker S, Surtees R, Rating D, Nyhan W (1993) Physiology and pathophysiology of organic acids in cerebrospinal fluid. *J Inherit Metab Dis* **16**: 648–669.
- Kolker S, Okun JG (2005) Methylmalonic acid—an endogenous toxin? *Cell Mol Life Sci* **62**: 621–624.
- Kolker S, Schwab M, Horster F, et al (2003) Methylmalonic acid, a biochemical hallmark of methylmalonic acidurias but no inhibitor of mitochondrial respiratory chain. *J Biol Chem* **278**: 47388–47393.
- Kowaltowski AJ, Maciel EN, Fornazari M, Castilho RF (2006) Diazoxide protects against methylmalonate-induced neuronal toxicity. *Exp Neurol* **201**: 165–171.
- Lamaout A, Mongalgi MA, Kaabachi N, et al (1998) Methylmalonic acidemia with bilateral globus pallidus involvement: a neuropathological study. *J Inherit Metab Dis* **21**: 639–644.
- Lash LH (2006) Mitochondrial glutathione transport: physiological, pathological and toxicological implications. *Chem Biol Interact* **163**: 54–67.
- Liu G, Hinch B, Beavis AD (1996) Mechanisms for the transport of alpha,omega-dicarboxylates through the mitochondrial inner membrane. *J Biol Chem* **271**: 25338–25344.
- Maciel EN, Kowaltowski AJ, Schwalm FD, et al (2004) Mitochondrial permeability transition in neuronal damage promoted by  $\text{Ca}^{2+}$  and respiratory chain complex II inhibition. *J Neurochem* **90**: 1025–1035.
- Malfatti CR, Royes LF, Francescato L, et al (2003) Intrastriatal methylmalonic acid administration induces convulsions and TBARS production, and alters  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity in the rat striatum and cerebral cortex. *Epilepsia* **44**: 761–767.
- Marisco PC, Ribeiro MCP, Bonini JS, et al (2003) Ammonia potentiates methylmalonic acid-induced convulsions and TBARS production. *Exp Neurol* **182**: 455–460.
- McLaughlin BA, Nelson D, Silver IA, Erecinska M, Chesselet MF (1998) Methylmalonate toxicity in primary neuronal cultures. *Neuroscience* **86**: 279–290.
- Morath MA, Okun JG, Muller IB, et al (2007) Neurodegeneration and chronic renal failure in methylmalonic aciduria—a pathophysiological approach. *J Inherit Metab Dis*, doi:10.1007/s10545-007-0571-5.
- Okun JG, Horster F, Farkas LM, et al (2002) Neurodegeneration in methylmalonic aciduria involves inhibition of complex II and the tricarboxylic acid cycle, and synergistically acting excitotoxicity. *J Biol Chem* **277**: 14674–14680.
- Palmieri F, Prezioso G, Quagliariello E, Klingenberg M (1971) Kinetic study of the dicarboxylate carrier in rat liver mitochondria. *Eur J Biochem* **22**: 66–74.
- Palmieri F, Quagliariello E, Klingenberg M (1972) Kinetics and specificity of the oxoglutarate carrier in rat-liver mitochondria. *Eur J Biochem* **29**: 408–416.
- Pettenuzzo LF, Ferreira Gd C, Schmidt AL, Dutra-Filho CS, Wyse AT, Wajner M (2006) Differential inhibitory effects of methylmalonic acid on respiratory chain complex activities in rat tissues. *Int J Dev Neurosci* **24**: 45–52.
- Reszko AE, Kasumov T, Pierce BA, et al (2003) Assessing the reversibility of the anaplerotic reactions of the propionyl-CoA pathway in heart and liver. *J Biol Chem* **278**: 34959–34965.
- Robinson BH, Chappell JB (1967) The inhibition of malate, tricarboxylate and oxoglutarate entry into mitochondria by 2-n-butylmalonate. *Biochem Biophys Res Commun* **28**: 249–255.
- Rosenthal RE, Hamud F, Fiskum G, Varghese PJ, Sharpe S (1987) Cerebral ischemia and reperfusion: prevention of brain mitochondrial injury by lidoflazine. *J Cereb Blood Flow Metab* **7**: 752–758.
- Royes LF, Figuera MR, Furian AF, et al (2003) Creatine protects against the convulsive behavior and lactate production elicited by the intrastriatal injection of methylmalonate. *Neuroscience* **118**: 1079–1090. Erratum in: *Neuroscience* (2004) **125**: 533.
- Rumbach L, Cremel G, Marescaux C, Warter JM, Waksman A (1989) Succinate transport inhibition by valproate in rat renal mitochondria. *Eur J Pharmacol* **164**: 577–581.
- Saad LO, Mirandola SR, Maciel EN, Castilho RF (2006) Lactate dehydrogenase activity is inhibited by methylmalonate in vitro. *Neurochem Res* **31**: 541–548.
- Sauer SW, Okun JG, Fricker G, et al (2006) Intracerebral accumulation of glutaric and 3-hydroxyglutaric acids secondary to limited flux across the blood–brain barrier constitute a biochemical risk factor for neurodegeneration in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Neurochem* **97**: 899–910.
- Schoolwerth AC, LaNoue KF (1985) Transport of metabolic substrates in renal mitochondria. *Annu Rev Physiol* **47**: 143–171.
- Singer TP (1974) Determination of the activity of succinate, NADH, choline, and alpha-glycerophosphate dehydrogenases. *Methods Biochem Anal* **22**: 123–175.
- Sluse FE, Meijer AJ, Tager JM (1971) Anion translocators in rat-heart mitochondria. *FEBS Lett* **18**: 149–153.
- Toyoshima S, Watanabe F, Saido H, Miyatake K, Nakano Y (1995) Methylmalonic acid inhibits respiration in rat liver mitochondria. *J Nutr* **125**: 2846–2850.
- Trinh BC, Melhem ER, Barker PB (2001) Multi-slice proton MR spectroscopy and diffusion-weighted imaging in methylmalonic



- acidemia: report of two cases and review of the literature. *Am J Neuroradiol* **22**: 831–833.
- Velho JA, Okanobo H, Degaspero GR, et al (2006) Statins induce calcium-dependent mitochondrial permeability transition. *Toxicology* **219**: 124–132.
- Wajner M, Coelho JC (1997) Neurological dysfunction in methylmalonic acidemia is probably related to the inhibitory effect of methylmalonate on brain energy production. *J Inherit Metab Dis* **20**: 761–768.
- Wajner M, Dutra JC, Cardozo SE, Wannmacher CMD, Motta ER (1992) Effect of methylmalonate on *in vivo* lactate release and carbon dioxide production by brain of suckling rats. *J Inherit Metab Dis* **15**: 92–96.
- Wajner M, Raymond K, Barschak A, et al (2002) Detection of organic acidemias in Brazil. *Arch Med Res* **33**: 581–585.
- Yu ACH, Drejer J, Hertz L, Schousboe A (1983) Pyruvate carboxylase activity in primary cultures of astrocytes and neurons. *J Neurochem* **41**: 1484–1487.